

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

Современные методы в БИО- ХИМИИ

Под редакцией академика АМН СССР
В. Н. ОРЕХОВИЧА



МОСКВА
«МЕДИЦИНА» 1977

ИЗДАНИЕ ОДОБРЕНО И РЕКОМЕНДОВАНО К ПЕЧАТИ
НАУЧНО-ИЗДАТЕЛЬСКИМ СОВЕТОМ
ПРЕЗИДИУМА АМН СССР

Современные методы в биохимии. ПОД РЕД. В. Н. ОРЕХОВИЧА. М., «Медицина», 1977, 392 с., ил.

Материал книги изложен в 68 разделах, сгруппированных в три части. Каждый раздел представляет краткое, но достаточно полное и точное описание одного или нескольких методов современной биохимии.

Первая часть посвящена методам исследования ряда ферментов и некоторых продуктов азотистого, окислительного и углеводного обменов у животных и человека. В сжатой форме изложены методы изучения окислительных систем печени, даны методы определения некоторых продуктов перекисного окисления липидов. Исследование углеводного обмена представлено рядом современных методов, в том числе методами пренатальной диагностики болезни Тея—Сакса и биохимической диагностики гликогенозов.

Во вторую часть входят методы исследования биологически активных пептидов, а также белков и ферментов, участвующих в их обмене. Исследование ангиотензиновой системы представлено флуориметрическим методом определения активности карбоксикапсина и способом выделения ангиотензиногена; исследование кининовой системы — методами очистки и определения активности калликрена и кининазы I из крови человека и др.

Из области изучения белков описаны некоторые общие методы (хроматография по сродству, колориметрический метод определения SH-групп в белках и др.), а также ряд частных методик исследования белков (ультрацентрифугирование липопротеидов крови и др.).

Третья часть книги включает некоторые методы исследования белоксинтезирующей системы животных клеток. В нее входят среди других такие методы, как метод определения времени синтеза полипептидной цепи, иммунохимический метод выделения индивидуальных полирибосом. Описаны также две бесклеточные белоксинтезирующие системы.

Книга предназначена для биохимиков как исследовательского, так и клинического профиля.

В книге 34 рис., 8 схем, 32 табл., библиография — 271 название.

For Summary see page 387.

I 50300—307
C 039(01)—77 71—77

ПРЕДИСЛОВИЕ

В 1964 и 1968 гг. вышли в свет подготовленные Институтом биологической и медицинской химии АМН СССР две книги из серии «Современные методы в биохимии». В предисловии к первой книге отмечалось, что количество методов, которые находят применение в биохимии, крайне велико и с каждым годом число их увеличивается, не говоря уже о безграничном количестве модификаций хорошо известных методов. Само собой разумеется, что с появлением новых значительное число ранее опубликованных методов теряет свое значение в силу их малой специфичности, недостаточной чувствительности, излишней сложности или недоступности некоторых реагентов. Разобраться в запутанном нагромождении методических рекомендаций трудно даже большому специалисту в узкой области биохимических исследований, а молодому исследователю это далеко не всегда удастся сделать самостоятельно. Учитывая сказанное, институт и поставил перед собой задачу систематически публиковать книги, в которых помещались бы описания наиболее эффективных и специфичных методов биохимических исследований.

Первый выпуск содержал двадцать шесть разделов, в которых подробно излагались главным образом методы выделения, физико-химической характеристики белков и нуклеиновых кислот и основных компонентов этих биополимеров.

Второй выпуск этой серии был посвящен методам определения и характеристики субклеточных структур и химических компонентов клеток и жидких сред организма.

По характеру изложения материала третий выпуск коренным образом отличается от предыдущих. Если в первых двух выпусках помещены большие разделы, в которых изложены теоретические основы отдельных методов и даже комплексов методов, подробно изложены фактические данные относительно применяемых приборов и т. д., то в третьем выпуске главное внимание уделено описанию техники эксперимента в предельно лаконичной форме. Это позволило включить описание 68 ме-

тодов вместо 20—25, как это имело место в каждом из опубликованных ранее выпусков. Активная работа по исследованию механизма биосинтеза белков стимулировала работу по созданию новых методов, которые позволяли бы решать эту проблему более эффективно и высококачественно. Поэтому, естественно, составители книги много внимания уделили описанию методов исследования белоксинтезирующей системы клеток животных. Таких методов семнадцать, что составляет 25% от общего числа публикуемых в книге. Среди них — «Методы определения времени синтеза полипептидной цепи», «Иммунохимический метод выделения индивидуальных полирибосом», «Метод выделения и очистки содержащей поли(А) мРНК из клеток млекопитающих», «Бесклеточная белоксинтезирующая система из клеток асцитной карциномы Кребс-2», «Бесклеточная микросомная система биосинтеза коллагена и других белков» и т. д.

Большое место в книге занимает описание методов, посвященных химии и биохимии ферментов. Среди них необходимо отметить большую группу методов исследования ферментов азотистого обмена и методов углеводного обмена, представляющих большой интерес для диагностики врожденных пороков обмена. Здесь следует указать на следующие методы: «Определение кетосахаров в биологических жидкостях», «Определение активности дисахаридаз в слизистой кишечника человека», «Методы биохимической диагностики гликогенозов», «Методы определения активности гексозаминидазы А с целью пренатальной диагностики болезни Тея—Сакса» и т. д.

Авторы пытались изложить прописи кратко, но достаточно ясно и четко, чтобы не только квалифицированные специалисты биологического и медицинского профиля, но и начинающие научные работники, аспиранты, врачи-лаборанты, студенты старших курсов смогли воспроизвести любой метод без существенных затруднений.

В конце книги приложена номограмма, которая позволяет выразить условия центрифугирования в числе g по известным скоростям (в об/мин) и радиусу (в см) ротора центрифуги.

Академик АМН СССР проф. В. Н. Орехович

ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ АЗОТИСТОГО, ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНОВ

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИАМИНОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

М. И. ТУРКОВ, Г. И. КЛИМОВА, Г. А. ДАВЫДОВА,
К. М. ЕРМОЛАЕВ, В. З. ГОРКИН

ПРИНЦИП МЕТОДА

Фермент диаминооксидаза (ДАО), амин: O_2 -оксидоредуктаза (дезаминирующая) (пиридоксальфосфатсодержащая), КФ 1.4.3.6, катализирует следующую реакцию:



где R — остаток алифатических диаминов, гистамина и некоторых других аминов. К числу последних относится и 4-нитробензиламин (НБМ) (Zeller, 1972).

Образующийся в пробах 4-нитробензальдегид (НБА) количественно переводят в его 4-нитрофенилгидразон и определяют концентрацию последнего путем измерения оптической плотности при 590 нм в щелочной среде.

РЕАКТИВЫ

4-Нитробензилбромид (ч., «Bidde Sawyer Co.», London).

4-Нитрофенилгидразин (ч., «Реахим»).

4-Нитробензальдегид (ч., Харьковский з-д хим. реактивов).

Гидразингидрат (ч. д. а., «Реахим»).

N,N-диметилформаид.

Трис-(оксиметил)-аминометан (ч., «Serva»).

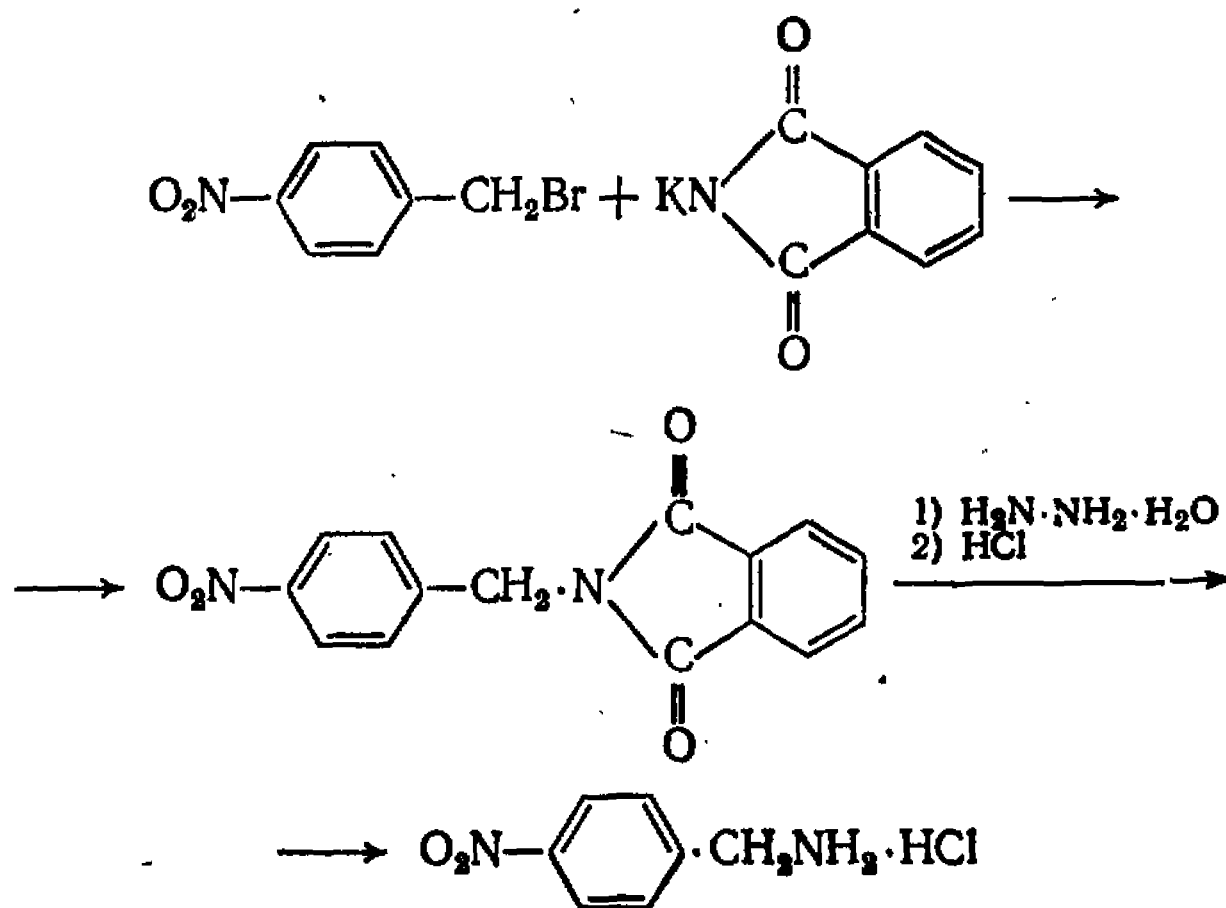
Гидрат окиси калия (ч., «VEB», из которого приготавливают 50% водный раствор КОН).

Этанол (96%).

Соляная кислота — концентрированная, 10% и 0,1 М водные растворы.

Фталимид калия.

Получение гидрохлорида 4-нитробензиламина (НБМ)



2,16 г (0,01 моля) 4-нитробензилбромид (ч., перекристаллизованный из этанола, т. пл. 90—100 °С) растворяют в 20 мл свежеперегнанного N,N-диметилформамида и смешивают при комнатной температуре с суспензией 1,85 г (0,01 моля) фталимида калия в 10 мл N,N-диметилформамида. Температура реакции повышается до 45 °С. Реакционную смесь оставляют при комнатной температуре на ночь, осадок бромида калия отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме. Остаток (1,6 г) переносят в трехгорлую колбу с мешалкой, обратным водяным холодильником и капельной воронкой, приливают 30 мл этанола, нагревают до кипения и при хорошем размешивании прибавляют по каплям из капельной воронки раствор 0,5 г гидразингидрата в 5 мл этанола. Наблюдается образование белого творожистого осадка. Затем прибавляют 5 мл концентрированной HCl и кипятят в течение 3 ч. Охлаждают до комнатной температуры, осадок отфильтровывают, фильтрат упаривают досуха. Остаток (900 мг) растворяют в 20 мл воды, подщелачивают водным раствором щелочи до pH 10,0 и экстрагируют этиловым эфиром. Объединенные эфирные экстракты (30 мл) встряхивают с 15 мл 10% раствора соляной кислоты. Кислый экстракт упаривают в вакууме досуха и остаток кристаллизуют из этанола. Получают 400 мг (23% от теоретического) гидрохлорида 4-нитро-

бензиламина в виде белых пластинчатых кристаллов с т. пл. 250—252 °С.

Найдено %: N — 14,69; 14,90%; $C_7H_9ClN_2O_2$. Вычислено %: N — 15,07%.

Получение 4-нитрофенилгидразона 4-нитробензальдегида

Смесь 0,31 г (0,002 моля) 4-нитробензальдегида и 0,31 г (0,002 моля) 4-нитрофенилгидразина в 15 мл этанола кипятят 5 мин. После охлаждения кристаллы гидразона отфильтровывают, промывают этанолом, затем этиловым эфиром. Выход — 0,55 г (96,5% от теоретического). После кристаллизации из 90 мл н.пропанола получают 0,45 г оранжевых кристаллов с т. пл. 249 °С.

Получение этанола, свободного от карбонильных соединений

К 0,5 л 96% этанола добавляют 0,5 г 2,4-динитрофенилгидразина и несколько капель концентрированной HCl. Смесь нагревают в колбе объемом 1 л с обратным холодильником в течение 10 ч при 78—79 °С, а затем отгоняют этанол при этой же температуре (песчаная баня; электрическая плитка с закрытой спиралью!).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 4-НИТРОБЕНЗАЛЬДЕГИДА (НБА)

В пробирки со шлифом вносят по 0,4 мл 0,05 М трис-HCl-буфера (pH 8,5), содержащего НБА (25 нмоль/мл). В контрольные пробы вносят равный объем буферного раствора, не содержащего НБА. Затем в опытные и контрольные пробы добавляют по 0,2 мл 0,1 М раствора HCl, содержащего 4-нитрофенилгидразин (1500 нмоль/мл), и по 0,30 мл дистиллированной воды. Величина pH в пробах должна быть равна 2,5. Пробирки плотно закрывают стеклянными пробками и после перемешивания содержимого инкубируют в водяной бане при 45 °С в течение 1 ч. Затем в пробы добавляют по 1,5 мл свободного от карбонильных соединений этанола и по 0,10 мл 50% раствора КОН, тщательно перемешивают и через 5—10 мин измеряют оптическую плотность при 590 нм (против контрольных проб). Содержание НБА в пробах устанавливают по калибровочному графику (рис. 1), построенному на основании результатов из-

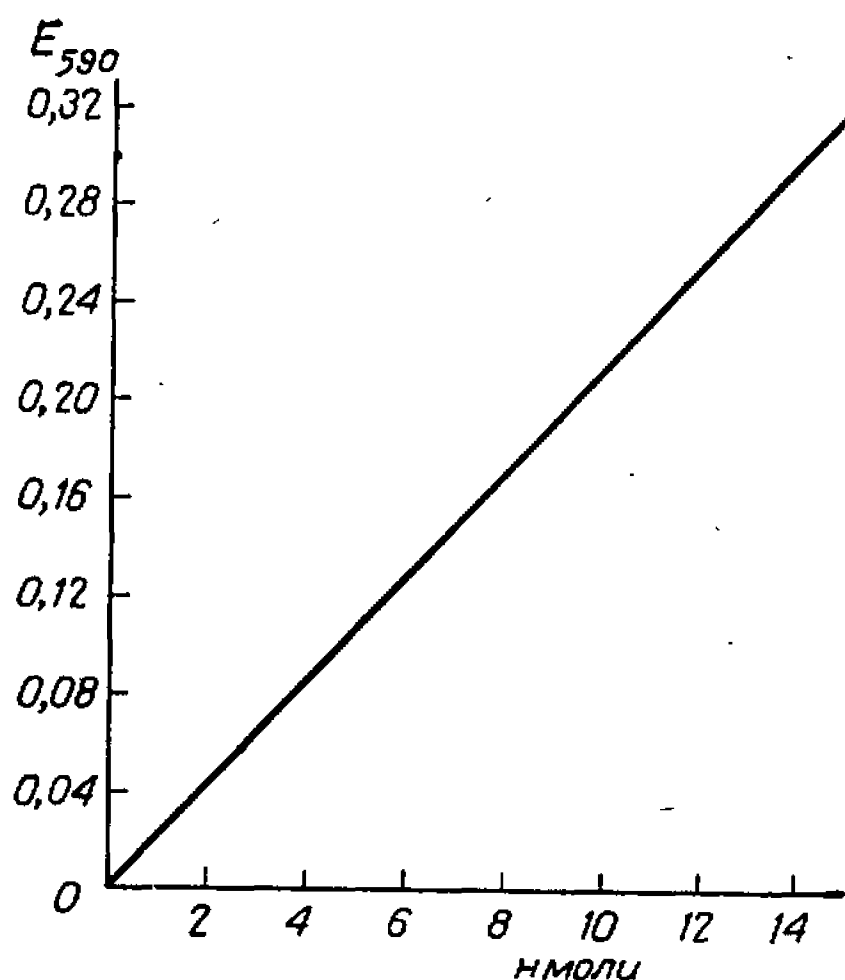


Рис. 1. Калибровочный график для определения содержания 4-нитробензальдегида.

На ординате — оптическая плотность при 590 нм; на абсциссе — количество 4-нитробензальдегида, содержащегося в пробе, в нанолях.

мерений при этих же условиях величин оптической плотности растворов синтетического 4-нитрофенилгидразона 4-нитробензальдегида.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАМИНОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ С 4-НИТРОБЕНЗИЛАМИНОМ (НБМ) В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА

Примером исследуемого материала может служить очищенный препарат ДАО с удельной активностью 400 нмоль путресцина, окисляемого за 1 мин на мг белка (Е. В. Горяченкова и соавт., 1967).

В пробу (конечный объем 0,5 мл) вносят 0,05 мл исследуемого материала (5 мкг очищенного препарата ДАО), 0,4 мл 0,05 М трис-НСl буфера (рН 8,5) и 0,05 мл водного раствора НБМ (5000 нмоль/мл). Пробы инкубируют в стеклянных пробирках, плотно закрытых пришлифованными пробками, в водяной бане при 37 °С в течение 20 мин. После окончания инкубации ферментативную реакцию прекращают внесением в пробы 4-нитрофенилгидразина, растворенного в НСl такой (предварительно подобранной) концентрации, которая необходима для доведения в пробах величины рН до 2,5. В контрольных пробах внесение субстрата и последующую инкубацию проводят после добавления раствора

4-нитрофенилгидразина, т. е. после инактивации фермента.

Об активности ДАО судят по количеству образовавшегося в пробах НБА, определение которого проводят, как описано выше.

ОЧИСТКА ДИАМИНОКСИДАЗЫ ИЗ ПОЧЕК СВИНЬИ

Л. Н. СТЕСИНА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДИАМИНОКСИДАЗЫ

Принцип. Определение основано на катализируемой диаминоксидазой (ДАО) реакции окисления путресцина:



Продукт реакции, 4-аминобутиральдегид, в результате внутримолекулярной конденсации образует Δ^1 -пирролин, который при взаимодействии с о-аминобензальдегидом образует окрашенное соединение, имеющее максимум поглощения при 430 нм (Holmstedt e. a., 1961).

Реактивы. 50 мМ раствор путресцина (тетраметилена-диамин $\cdot 2\text{HCl}$), насыщенный водный раствор о-аминобензальдегида, 0,067 М Na-K-фосфатный буфер (рН 7,5), 50% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Ход определения. В пробы вносят 1 мл буфера, 0,2 мл раствора путресцина, 0,5 мл водного насыщенного раствора о-аминобензальдегида, 0,05—0,2 мл раствора фермента и воду до объема 2,8 мл. Пробы насыщают кислородом в течение 1—2 мин и инкубируют при 37 °С в течение 20—40 мин (в зависимости от активности фермента). Реакцию останавливают добавлением 0,2 мл 50% ТХУ. Осадок отделяют центрифугированием и измеряют оптическую плотность при 430 нм в 10 мм кюветах спектрофотометра СФ-16. Проба без субстрата служит контролем.

Количество окисленного путресцина рассчитывают по количеству образовавшегося аммиака, которое определяют по калибровочному графику, представляющему кривую изменения оптической плотности в пробах, содержащих о-аминобензальдегид, с количеством аммиака,

определенного в идентичных пробах методом изометрической отгонки с последующей несселеризацией.

За единицу активности ДАО принимают количество фермента, катализирующее окисление 1 нмоля путресцина в минуту при данных условиях опыта. Удельную активность выражают в единицах активности на 1 мг белка. Концентрацию белка определяют по методам Кьельдаля или Лоури (Lowry e. a., 1951)*.

ОЧИСТКА ФЕРМЕНТА

Фермент диаминооксидазу (ДАО) выделяют из гомогенатов коркового слоя почек свиньи, используя контролируемое нагревание, высаливание сульфатом аммония, адсорбцию на ДЭАЭ-целлюлозе и гидроокиси алюминия (Е. В. Горяченкова и др., 1967), с последующей гельфильтрацией через колонку с биогелем Р-300.

Получение гомогената

Свежие (или хранившиеся при -20°C не более 10—12 дней) почки свиньи отделяют от мозгового слоя и гомогенизируют в 100 мМ фосфатном буфере (рН 6,8) в гомогенизаторе типа Уоринга в течение 5 мин. Используют 50% гомогенат.

Прогревание

Полученный гомогенат при постоянном перемешивании прогревают на водяной бане в течение 20 мин при 60°C . Осадок денатурированных белков и фрагменты клеток отделяют центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин.

Фракционирование сульфатом аммония

К полученной надосадочной фракции добавляют при постоянном помешивании и контролировании величины рН кристаллический сульфат аммония до насыщения 0,35. Величину рН 6,8 поддерживают путем добавления 4%

* Книги и статьи, написанные коллективом (4 и более) авторов, приведены в списке литературы в соответствии с ГОСТ 7.1-69 по названию, а в тексте отмечены звездочкой.

раствора аммиака. После прибавления сульфата аммония материал оставляют на 3—4 ч, а затем центрифугируют при 4000 g в течение 10 мин. Осадок отбрасывают, к надосадочной жидкости добавляют сульфат аммония до насыщения 0,50 и оставляют на 3—4 ч. После центрифугирования при 4000 g в течение 10 мин надосадочную жидкость отбрасывают, осадок растворяют в минимальном объеме 100 mM фосфатного буфера (pH 6,8).

Повторное прогревание

Полученный раствор ферментного препарата прогревают на водяной бане при 58°C в течение 10 мин при постоянном перемешивании. Затем для удаления денатурированных балластных белков раствор препарата центрифугируют при 4000 g в течение 15 мин. Надосадочную фракцию диализуют против 10 mM фосфатного буфера (pH 7,0) до полного освобождения от ионов аммония.

Обработка ДЭАЭ-целлюлозой

ДЭАЭ-целлюлозу предварительно уравнивают 10 mM фосфатным буфером (pH 7,0) и добавляют к диализованному препарату фермента в соотношении 10—15 г сухой массы ДЭАЭ-целлюлозы на 1,5—2,0 г белка. По истечении 30 мин ДЭАЭ-целлюлозу отделяют фильтрованием на бюхнеровской воронке. Элюцию ферментного белка с ДЭАЭ-целлюлозы проводят фосфатным буфером (pH 7,0) возрастающей концентрации (10, 30, 60, 80 и 100 mM). Фракции, полученные при элюции 60 и 80 mM буферными растворами, содержат 90—95% активности ДАО по сравнению с активностью исходного (до обработки ДЭАЭ-целлюлозой) препарата.

Обработка гелем гидроокиси алюминия C_γ

Фракции, обладающие активностью ДАО, объединяют и к полученному объему добавляют гель гидроокиси алюминия с таким расчетом, чтобы отношение массы белка к сухой массе геля было равным 2:1. После перемешивания в течение 30—40 мин пробы центрифугируют при 2000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость, не обладающую активностью ДАО, отбрасывают. Элюцию

ферментного белка с геля проводят фосфатным буфером (рН 7,6) возрастающей концентрации (10, 15, 20, 25, 35 и 40 мМ) при постоянном перемешивании в течение 15—20 мин с последующим центрифугированием при 2000 g (15 мин). Активность ДАО содержат фракции белков, извлекаемые 25, 30 и 35 мМ растворами фосфатного буфера. Эти фракции объединяют и диализуют в течение 5—6 ч против 100 мМ фосфатного буфера (рН 7,0).

Повторная обработка гелем гидроокиси алюминия C_γ

К полученному после диализа материалу добавляют гель гидроокиси алюминия C_γ с таким расчетом, чтобы отношение белка к гелю по сухой массе было равным

Таблица 1

Очистка диаминооксидазы из почек свиньи (пример опыта)

Этап очистки	Характеристика фракций						
	объем, мл	активность, ед*/мл	общая активность, ед.	концентрация белка, мг/мл	удельная активность, ед/мг	выход, %	степень очистки
Гомогенат	4000	33	132000	141,5	0,2	100	1
Прогревание	1600	80	128000	58	1,3	97	16,5
Фракционирование сульфатом аммония	200	136	27200	37	3,6	20,4	18
Повторное прогревание	200	134	26800	32,5	4,1	20	20,5
Обработка ДЭАЭ-целлюлозой	250	75	18750	4,5	16,6	14	83
Обработка гелем гидроокиси алюминия C_γ	90	133	11970	1,3	103	9,1	515
Повторная обработка гелем гидроокиси алюминия C_γ	30	346	10320	0,7	494	8	2470
Хроматография на колонке с биогелем Р-300	9	81	729	0,1	810	0,55	4050

* За единицу диаминооксидазной активности принято количество фермента, катализирующее окисление 1 имоля путресцина за 1 мин при 37 °С в 1 мМ фосфатном буфере (рН 7,5).

3 : 1. После 40-минутного перемешивания пробы центрифугируют при 2000 g в течение 5 мин. Надосадочную фракцию отбрасывают. Адсорбированные на геле белки элюируют минимальными объемами фосфатных буферов (рН 7,6) возрастающей концентрации (125, 150, 175, 200, 225, 250 мМ). После 15 мин перемешивания геля с каждой порцией буфера пробы центрифугируют при 2000 g 5 мин.

Фракции белков, извлекаемые 175, 200, 225 и 250 мМ буферными растворами, содержат 70—75% активности ДАО исходного гомогената (табл. 1).

Хроматография на колонке с биогелем Р-300

На колонку объемом 45 мл (1,5×30 см) с биогелем Р-300, предварительно промытую 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,6), наносят 1,2 мл (3,2 мг белка) материала, полученного на предыдущем этапе очистки. Затем через колонку пропускают 100 мМ фосфатный буфер (рН 7,6) со скоростью 0,05 мл/мин. Фракции объемом 1 мл собирают при помощи автоматического коллектора. Наибольшую активность ДАО, которая составляет 1,5—2,0% активности исходного гомогената, содержат фракции № 8—12. Удельная активность препарата ДАО на этом этапе превышала удельную активность исходного гомогената в 3500—4000 раз (см. табл. 1).

Анализ полученных препаратов фермента методом зонального электрофореза в полиакриламидном геле обнаруживает единственную отчетливую белковую полосу.

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОЧИСТКИ ДИАМИНОКСИДАЗЫ ИЗ ПОЧЕК СВИНЬИ

Г. И. КЛИМОВА

Активность диаминоксидазы (ДАО) определяют по образованию хлоргидрата 2,3-триметилен-1,2-дигидрохиназолина (максимум поглощения — 430 нм) при окислительном дезаминировании путресцина в присутствии о-аминобензальдегида (Holmstedt e. a., 1961).

ОЧИСТКА

Метод получения препаратов ДАО из почек свиньи (Е. В. Горяченкова и др., 1967), модифицированный Л. Н. Стесиной (Ж. И. Акопян и др., 1972*; см. также Л. Н. Стесина, с. 9 настоящей книги), был изменен с целью исключения стадии нагревания (58°C). Это дало возможность получить препараты фермента с 4—8 SH-группами на моль белка, в то время как в препаратах, полученных по методу, включающему нагревание, удавалось обнаружить не более 4 SH-групп.

Для получения высокоочищенных препаратов на последней стадии очистки используют метод «обратной экстракции» растворами сульфата аммония (Jakoby, 1968).

Получение гомогената

Все процедуры проводят при $5-6^{\circ}\text{C}$. 1600 г коркового слоя почек (свежих или хранившихся при -20°C в течение 1—2 нед) гомогенизируют порциями с 1600 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0) в течение 3 мин в гомогенизаторе РТ-1 и затем центрифугируют при 35 000 g в течение 45 мин. Осадок отбрасывают.

Фракционирование сульфатом аммония

К надосадочной жидкости добавляют кристаллический сульфат аммония до 0,43 насыщения. Поддерживают рН около 7,0 добавлением 4% раствора NaOH. Материал оставляют на холоду в течение $2\frac{1}{2}$ ч (или на ночь), затем центрифугируют при 20 000 g в течение 20 мин. К надосадочной жидкости добавляют сульфат аммония до 0,53 насыщения и снова центрифугируют. Полученный осадок растворяют в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0), диализуют в течение 18 ч против 4—5 смен буфера. Если в процессе диализа появился нерастворимый материал, его удаляют центрифугированием (35 000 g, 20 мин).

Адсорбция на ДЭАЭ-целлюлозе

ДЭАЭ-целлюлозу (в хлоридной форме), предварительно промытую 0,01 М фосфатным буфером (рН 7,0),

добавляют к диализату в количестве 30—35 г (сухая масса). После выдерживания в течение 40 мин на холоду при периодическом перемешивании ДЭАЭ-целлюлозу отделяют на воронке Бюхнера и проводят элюцию ДАО путем размешивания ДЭАЭ-целлюлозы с 200—250 мл фосфатного буфера (рН 7,0) возрастающей концентрации (0,01, 0,03, 0,06, 0,08, 0,10 М).

1-я адсорбция на геле гидроокиси алюминия

Фракции, содержащие наибольшую активность ДАО, объединяют и проводят адсорбцию на геле гидроокиси алюминия. Предварительно определяют для каждого препарата геля наилучшее соотношение количества белка в растворе фермента к сухой массе геля при «положительной» адсорбции. В опыте по очистке, представленном в табл. 2, использовали отношение 1 : 2. Перед добавлением адсорбента к раствору фермента избыток воды из геля удаляют центрифугированием (2500 г, 2 мин).

Суспензию периодически перемешивают в течение 40 мин и затем центрифугируют. Белки, адсорбированные на геле гидроокиси алюминия, элюируют ступенчато 50—60 мл фосфатного буфера (рН 7,6) возрастающей концентрации — от 0,15 до 0,45 М (концентрация каждого последующего буфера превышает концентрацию предыдущего на 0,05 М). Элюцию проводят при периодическом перемешивании в течение 10 мин, затем центрифугируют.

Фракции с наибольшей удельной активностью ДАО объединяют и диализуют в течение ночи против 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,0).

2-я адсорбция на геле гидроокиси алюминия

К диализату добавляют такое количество геля гидроокиси алюминия, чтобы отношение количества белка в диализате к сухой массе геля составляло 1 : 2. Адсорбцию проводят в течение 40 мин при периодическом перемешивании. После центрифугирования адсорбированные белки элюируют минимальными объемами фосфатного буфера (рН 7,6), концентрацию которого постепенно повышают — каждый раз на 0,025 М (от 0,15 до 0,30 М).

Обратная экстракция сульфатом аммония*

К материалу, полученному на предыдущем этапе, добавляют такое количество насыщенного раствора сульфата аммония (рН 7,0—7,4), чтобы концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в пробе была равна 28% (весовые проценты). Через 5—10 мин суспензию центрифугируют при 10 000 g в течение 10 мин и полученный осадок растирают в стеклянном гомогенизаторе с 1—2 мл 26% раствора сульфата аммония, приготовленного на 0,05 М фосфатном буфере или на воде. Суспензию центрифугируют (10 000 g, 10 мин). Аналогичным образом проводят экстракцию осадка 24%, 22%, 20%, 18% растворами сульфата аммония. К полученным надосадочным жидкостям добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до концентрации, равной 28%. Пробы центрифугируют (10 000 g, 10 мин), полученные осадки растворяют в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0) и диализуют против того же буфера. В диализате определяют содержание белка и активность ДАО.

На этой стадии удавалось получить белок с удельной активностью, равной 1000 ед/мг белка, однако выход белка небольшой.

Таблица 2

Очистка ДАО из почек свиньи (пример опыта)

Этап очистки	Характеристика фракций						
	объем, мл	общий белок, мг	активность			степень очистки	выход, %
			ед*/ мл	общая	удель- ная, ед/мг		
Гомогенат	3200	235000	23,5	75500	0,32	1	100
Осаждение (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,43— 0,53 насыщения	176	7100	200,0	35200	4,96	15,5	46,7
Адсорбция на ДЭАЭ-целлюлозе	435	1300	57,5	25000	18,5	58	33,2
1-я адсорбция на геле гидроокиси алюминия	120	87	117,0	14050	170	532	18,6
2-я адсорбция на геле гидроокиси алюминия	18	13	292,5	5260	400	1250	6,9

* Эту последнюю стадию проводят не при каждой очистке белка, а по мере необходимости.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОАМИНОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ПОМОЩИ ДИХЛОРИЗОЦИАНУРАТНОЙ РЕАКЦИИ

Р. С. КРИВЧЕНКОВА

ПРИНЦИП МЕТОДА

Моноаминоксидаза митохондрий, амин: O_2 -оксидоредуктаза (дезаминирующая), (флавинсодержащая), КФ 1.4.3.4, катализирует реакцию:



где R — алифатические или ароматические радикалы.

О величине моноаминоксидазной активности можно судить по количеству аммиака, отщепляемого при инкубировании тех или иных моноаминов-субстратов с препаратами митохондрий. Для определения содержания аммиака в пробах используют высокочувствительную специфическую реакцию, основанную на способности аммиака образовывать в щелочной среде в присутствии солей дихлоризоциануровой кислоты, салицилата и нитропруссиды окрашенное в зеленый цвет соединение с максимумом поглощения при 660 нм (Reardon e. a., 1966).

По чувствительности метод определения содержания аммиака с помощью дихлоризоциануратного реактива превосходит метод, основанный на известной реакции с реактивом Несслера, примерно в 10 раз. Поэтому дихлоризоциануратную реакцию для определения активности моноаминоксидазы удобно использовать в тех случаях, когда активность фермента низкая или количество исследуемого материала невелико. В принципе данная методика может быть применена при изучении любой ферментативной реакции, сопровождающейся освобождением аммиака.

РЕАКТИВЫ

Тирамин гидрохлорид.

Серотонин адипинат или креатинсульфат.

12% раствор салицилата натрия, содержащий 0,06% нитропруссиды натрия.

0,2% раствор дихлоризоцианурата калия в 1 н. растворе едкого кали (препарат выпускает Чернореченский

хим. комбинат им. М. И. Калинина, г. Дзержинск Горьковской обл.).

0,05 н. раствор серной кислоты.

Насыщенный прокипяченный раствор карбоната калия.

50% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

0,2 М К-На-фосфатный буфер (рН 7,4).

Выделение митохондрий и подготовка ферментных препаратов описаны ранее (В. З. Горкин и др., 1968)*.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В пробы вносят по 100—400 мкг белка митохондрий, например печени крысы (обычно в 0,1—0,4 мл буферного раствора), субстрат (тирамин, серотонин или другие моноамины) по 1 мкмоль (обычно в 0,2 мл буферного раствора) и 0,1 М К—На-фосфатный буфер (рН 7,4) до конечного объема 1,8 мл. Инкубацию проб проводят в атмосфере кислорода при 37 °С в течение 60 мин в водяной бане. По окончании инкубации пробы фиксируют добавлением 0,2 мл 50% раствора ТХУ (конечная концентрация 5%). Образующийся осадок отделяют центрифугированием (центрифуга ЦУМ-1, 600 g, 3 мин). В надосадочной жидкости определяют содержание аммиака методом изотермической отгонки по Конвею с последующим проведением дихлоризоциануратной реакции. Для этого в наружное отделение чашки Конвея, края которой предварительно покрывают смазкой, помещают 0,7 мл надосадочной жидкости, а в центральное отделение чашки — 1 мл 0,5 н. раствора серной кислоты. После добавления к испытуемому раствору 1,5 мл насыщенного водного раствора карбоната калия чашку быстро закрывают и оставляют при комнатной температуре на 17—20 ч. Аммиак, вытесненный карбонатом калия в наружном отделении чашки Конвея, поглощается в центральном отделении серной кислотой. После окончания отгонки в центральное отделение чашки Конвея прибавляют по 0,5 мл раствора салицилата натрия, а затем по 0,5 мл дихлоризоцианурата калия. Через 30 мин содержимое центрального отделения чашки Конвея количественно переносят в мерную пробирку, в которую затем добавляют бидистиллированную воду до общего объема 4 мл. После тщательного перемешивания оптическую плотность проб измеряют на спектрофотометре при дли-

не волны 660 нм (кюветы с длиной хода луча 1 см). Разность между величинами оптической плотности в опытной пробе и контрольной, содержащей буферный раствор вместо надосаочной жидкости, соответствует содержанию аммиака в этой пробе. Последнее рассчитывают по калибровочной кривой, для построения которой используют раствор сульфата аммония, содержащий 0,1 мкмоля аммиака в 1 мл.

В биологических опытах обязательным условием проведения дихлоризоциануратной реакции является изотермическая отгонка аммиака. Определению аммиака «прямым» способом (т. е. без отгонки в чашках Конвея) в присутствии дихлоризоциануратного реактива мешает наличие в пробах небольших количеств белка и некоторых азотсодержащих соединений (Scely e. a., 1967).

Чтобы избежать значительного расхождения результатов определений в параллельных пробах, необходимо готовить все растворы на бидистиллированной безаммиачной воде, споласкивать этой водой посуду и работать в помещениях, не содержащих следов аммиака в воздухе.

В описанных выше условиях постановки опыта при внесении в пробы 350 мкг белка митохондрий печени крыс и 1 мкмоля тирамина или серотонина количество освобожденного аммиака составляло $0,35 \pm 0,02$ и $0,29 \pm 0,01$ мкмоля соответственно.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОАМИНОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ С П-НИТРОФЕНИЛЭТИЛАМИНОМ В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА

Г. Д. ИСАХАНИЯН, Ж. И. АКОПЯН

ПРИНЦИП МЕТОДА

При катализируемом моноаминоксидазой (КФ 1.4.3.4) окислительном дезаминировании п-нитрофенилэтиламина образуется окрашенный продукт взаимодействия п-нитрофенилуксусного альдегида с избытком субстрата, который в сильно щелочной среде экстрагируют н. бутанолом. Колориметрированию подвергают совершенно прозрачную бутаноловую фазу.

РЕАКТИВЫ

50 мМ водный раствор п-нитрофенилэтиламина·НСl (Московский завод им. Войкова): 101 мг препарата растворяют в 10 мл воды.

0,2 М калий-фосфатный буфер (рН 7,4).

Н. бутиловый спирт.

0,5% водный раствор едкого натра.

Индикаторная бумага «Мультифан» (ЧССР).

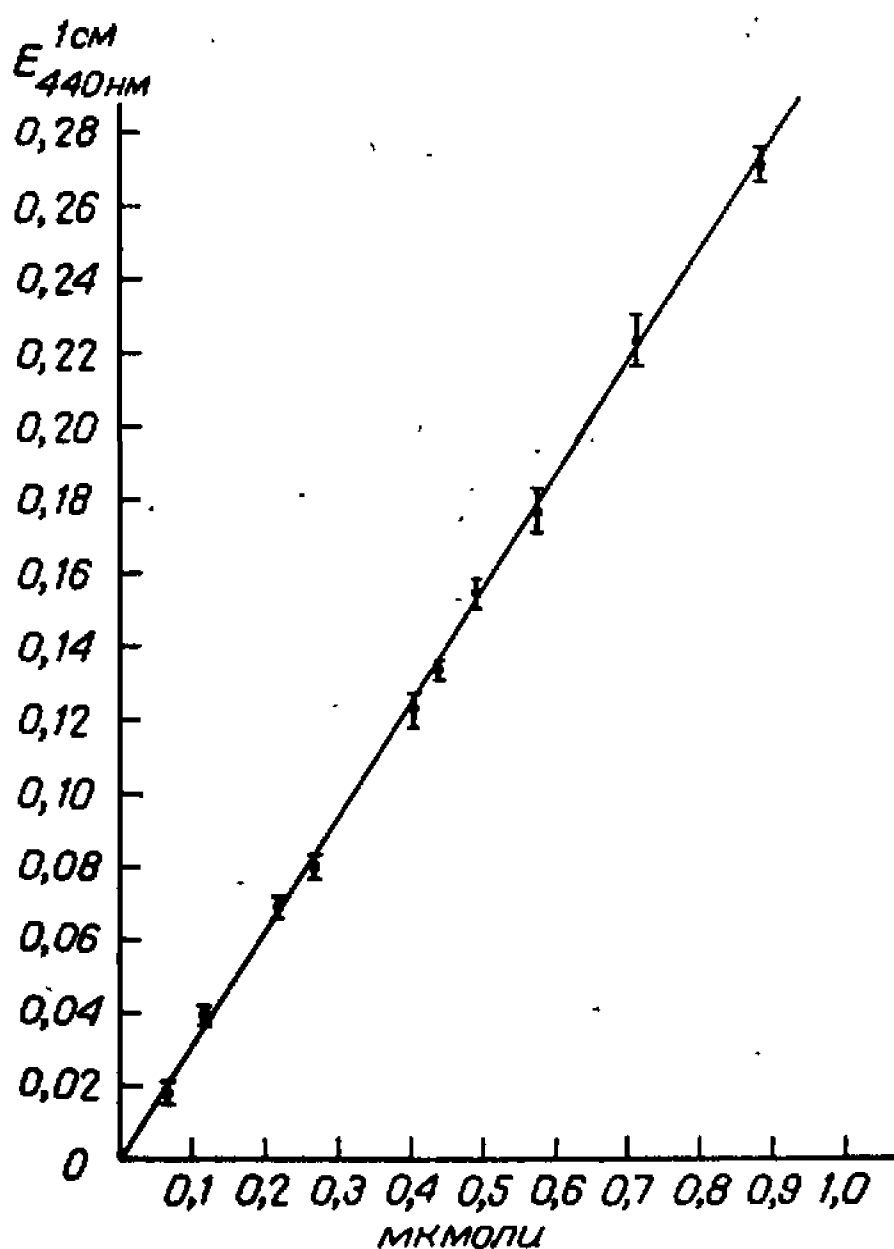
ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В пробирки, снабженные нормальным шлифом, вносят 1 мл исследуемого материала, например суспензии митохондрий (0,5—5 мг белка), 1 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,1 мл 50 мМ раствора п-нитрофенилэтиламина (5 мкмоль субстрата) и воды до общего объема 3 мл. Пробы тщательно перемешивают и помещают в термостат при 37 °С на 45 мин (в этих условиях реакция дезаминирования п-нитрофенилэтиламина следует уравнению нулевого порядка). Сразу после окончания инкубации моноаминоксидазу инактивируют добавлением в пробы 0,5% раствора едкого натра до рН 10,0, о чем судят по изменению цвета индикаторной бумаги «Мультифан». Затем в пробирки вносят по 4 мл н. бутанола, закрывают их притертыми пробками и сильно встряхивают в течение 1 мин. Содержимое пробирок переносят в полиэтиленовые центрифужные пробирки и центрифугируют 5 мин при 4000 g (центрифуга ЦУМ-1). Верхнюю (бутаноловую) фазу осторожно переносят в кювету (длина луча 10 мм) спектрофотометра СФ-4. Величину оптической плотности измеряют при 440 нм против бутаноловой фазы, полученной при аналогичной обработке контрольной пробы, в которую вносят все перечисленные выше компоненты, кроме субстрата.

Чем больше моноаминоксидазная активность, тем выше измеряемые величины оптической плотности. На рис. 2 представлено сравнение полученных значений оптической плотности в опытах с митохондриями печени крыс с результатами измерений моноаминоксидазной активности, выполненных другим методом — по скорости освобождения аммиака (В. З. Горкин и др., 1968)*, в строго идентичных условиях с п-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата. Полученная прямая может

Рис. 2. Зависимость между количеством аммиака, освобождаемого при дезаминировании п-нитрофенилэтиламина митохондриями печени крысы, и оптической плотностью бутанолового экстракта параллельных проб.

На ординате — оптическая плотность при 440 нм; на абсциссе — количество аммиака в пробе в микромолях.



быть использована как калибровочный график для перевода величин оптической плотности бутанолового экстракта в мкмоль аммиака, освобождающегося при реакции окислительного дезаминирования п-нитрофенилэтиламина.

МЕТОДЫ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ И ОЧИСТКИ МОНОАМИНОКСИДАЗ МИТОХОНДРИЙ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Ферменты моноаминоксидазы, катализирующие реакции окислительного дезаминирования аминов, в тканях животных сосредоточены преимущественно в митохондриях, где они прочно связаны с фрагментами мембран митохондрий. Поэтому отделение моноаминоксидаз от структурных элементов мембран (солюбилизация) и последующая очистка этих ферментов весьма затруднительны. В различных органах и у животных разных видов моноаминоксидазы значительно отличаются по многим свойствам. Ниже приведены прописи основанных

на разных принципах методов солюбилизации и очистки моноаминоксидаз из четырех различных биологических объектов.

Выбор того или иного метода определяется задачами исследования, наличием соответствующих биологических объектов, оборудования и реактивов. Ни один из описанных методов нельзя признать «наилучшим» во всех случаях.

СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ НЕИОННЫМ ДЕТЕРГЕНТОМ И ОЧИСТКА МОНОАМИНОКСИДАЗЫ МОЗГА БЫКА

Т. А. МОСКВИТИНА

Определение активности

Определение активности моноаминоксидазы основано на том, что при дезаминировании п-нитрофенилэтиламина образуется окрашенный продукт, количество которого можно измерить фотометрически (В. З. Горкин и др., 1968)*.

Реактивы. 50 мМ раствор п-нитро-β-фенилэтиламина (ПН) в 0,2 М К—Na-фосфатном буфере (рН 7,4).

25% водный раствор неионного детергента ОП-10.

Ход определения. К 1 мл буфера добавляют 0,3 мл раствора ОП-10, 0,1 мл 50 мМ раствора ПН (субстрат) и такое количество раствора фермента, чтобы содержание отщепившегося аммиака не превышало 0,4 мкмоля на пробу. Общий объем пробы доводят водой до 3 мл. Инкубируют пробы при 37°C в течение часа. По окончании инкубации измеряют оптическую плотность в 10 мм кювете на ФЭК-57Н с использованием светофильтра № 3. Выделению 0,1 мкмоля аммиака соответствует изменение оптической плотности на 0,125.

За единицу активности фермента принимают его количество, катализирующее образование 1 нмоля аммиака за 1 мин при вышеуказанных условиях определения. Содержание белка определяют по методу Лоури (Л. М. Гинопдман, 1964). Для построения калибровочных кривых используют растворы кристаллического бычьего сывороточного альбумина, содержащие неионный детергент ОП-10 в концентрациях, соответствующих

тем, что имеются в исследуемых пробах. Количество не-ионного детергента определяют по калибровочной кривой с бромтимоловым синим (Schwartz e. a., 1958).

Очистка фермента

Солюбилизацию фермента осуществляют в присутствии детергента в сильно щелочной среде при защите активного центра субстратом. Солюбилизованный таким образом фермент подвергают очистке без применения процедур, которые могут вызвать изменение специфичности фермента (В. З. Горкин, 1972).

Реактивы и материал

0,25 М раствор сахарозы (рН 7,6).

Бензиламин (основание).

25% раствор детергента ОП-10.

Гель гидроокиси алюминия S_{α} .

Насыщенный раствор сульфата аммония (перед употреблением доводят аммиаком до рН 7,6).

1 М раствор двузамещенного фосфата калия.

1 М раствор однозамещенного фосфата натрия.

0,01 М и 0,004 М К—Na-фосфатный буфер (рН 7,6).

0,9% раствор хлорида калия.

Мозг крупного рогатого скота получают с бойни и хранят во льду. Вся последующая работа, если это специально не оговорено, проводится на холоду.

Выделение митохондрий

После удаления коры и мозжечка ткань мозга очищают от пленок, промывают 0,9% раствором KCl. Для однократного выделения используют 1,5 кг ткани. Порции по 100 г гомогенизируют в течение минуты с 500 мл 0,25 М раствора сахарозы в гомогенизаторе типа Уоринга. Полученную суспензию подщелачивают 1 М раствором K_2HPO_4 до рН 7,6 (обычно требуется 7—15 мл), фильтруют через 4 слоя марли и смешивают с 13,5 л раствора сахарозы. Клеточные ядра отделяют центрифугированием при 1500 g в течение 10 мин. Осадок отбрасывают. Надосадочную жидкость для осаждения митохондрий центрифугируют 20 мин при 24 000 g. Надосадочную жидкость отбрасывают. Осадок гомогенизи-

руют отдельными порциями в стеклянном гомогенизаторе типа Поттера — Эльвегейма с 6250 мл 0,25 М раствора сахарозы и снова центрифугируют при тех же условиях, что и раньше. Полученные митохондрии гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе с 1250 мл бидистиллированной воды (рН 6,0—7,0) и центрифугируют при 40 000 g в течение 45 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок суспендируют в 500 мл бидистиллированной воды, гомогенизируют и замораживают при -20°C . В таком состоянии митохондрии могут храниться в течение 2 мес.

С о л ю б и л и з а ц и я

Часть митохондрий оттаивают, разводят водой до получения суспензии, в 1 мл которой содержится 8 мг белка. При помешивании добавляют бензиламин из расчета 0,125 мл на каждые 100 мл суспензии (рН 11,2). Выдерживают 30 мин, после чего центрифугируют при 40 000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок суспендируют в бидистиллированной воде до получения первоначального объема. К полученной суспензии (рН 10,7) на холоду добавляют 25% раствор ОП-10 из расчета 4 мл на каждые 100 мл суспензий. Через 30 мин суспензию центрифугируют (40 000 g, 30 мин) и осадок отбрасывают. Надосадочную жидкость доводят 1 М раствором Na_2HPO_4 до рН 8,0 и диализуют в течение ночи против 35 объемов 0,004 М фосфатного буфера (рН 7,6).

О б р а б о т к а г е л е м

г и д р о о к с и а л ю м и н и я C_β в объеме

К полученному сильно опалесцирующему раствору при рН 8,0 добавляют суспензию геля гидроокиси алюминия C_β . Необходимое количество геля каждый раз подбирают экспериментально с тем, чтобы достичь максимальной для данных условий степени очистки за счет удаления адсорбируемых гелем балластных белков. Обычно на геле одновременно адсорбируется и отбрасывается после центрифугирования до 50% исходной активности. Обработку проводят при комнатной температуре и периодическом помешивании. Через 20 мин взвесь центрифугируют при 10 000 g 3 мин, осадок отбрасывают.

Осаждение сульфатом аммония

К полученной надосадочной жидкости при рН 7,6 в присутствии 0,4% раствора ОП-10 добавляют насыщенный раствор сульфата аммония из расчета 54 мл на каждые 100 мл надосадочной жидкости. Через 2 ч центрифугируют 10 мин при 30 000 g. Всплывший осадок собирают и растворяют в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,6 ($\frac{1}{5}$ первоначального объема надосадочной жидкости) и диализуют против 300-кратного избытка 0,004 М фосфатного буфера (рН 7,6) в течение 20 ч с пятикратной сменой буфера.

Обработка детергентом ОП-10

К диализату, свободному от следов ионов аммония, добавляют детергент ОП-10 до конечной 1% концентрации. Через час взвесь центрифугируют при 40 000 g в течение 30 мин, осадок отбрасывают. Прозрачный раствор имеет слабо желтую окраску и небольшую опалесценцию.

Повторная обработка гелем гидроокиси алюминия С_β

Полученную надосадочную жидкость обрабатывают гелем гидроокиси алюминия так же, как на одной из предыдущих стадий. Обычно при повторной обработке гелем адсорбируется около 10% активности.

Свойства ферментного препарата

Выделенный препарат фермента содержит 3—5% моноаминоксидазной активности исходного гомогената. Удельная активность фермента с использованием тирамина в качестве субстрата составляет около 100 нмоль аммиака в 1 мин на 1 мг белка. Содержание неионного детергента 0,3—0,4%. Электрофореграмма препарата в полиакриламидном геле, включающем в свой состав детергент, представляет единую балковую полосу. Белок, соответствующий этой полосе, обладает моноаминоксидазной активностью. Препарат фермента используют в течение 3—4 дней. Фермент легко окисляется в процессе выделения, поэтому перед работой необходима инкубация его с 1 мМ раствором дитиотреитола в течение 1—3 ч.

Т а б л и ц а 3

Очистка моноаминоксидазы из митохондрий мозга быка
(пример опыта)

Этап очистки	Характеристика фракций						
	объем, мл	активность, ед/мл	общая актив-ность, ед	концентрация белка, мг/мл	удельная ак-тивность, ед/мг	выход, %	степень очистки
Гомогенат	4000	4,07	16300	6,0	0,68	100	1,0
Выделение мито-хондрий	200	43,5	8650	13,56	3,20	53	4,7
Солюбилизация	168	19,7	3310	3,97	4,95	20,1	7,1
Обработка гелем гидроокиси алюми-ния C_β	196	12,0	2350	1,35	8,85	14,4	13,0
Осаждение суль-фатом аммония	64	34,8	2230	2,20	15,8	13,7	23,2
Обработка детер-гентом ОП-10	43	29,1	1255	0,98	29,7	7,7	43,6
Повторная обра-ботка гелем гидро-окиси алюминия C_β	43	20,6	885	0,45	45,7	5,4	67,0

СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ НЕИОННЫМ ДЕТЕРГЕНТОМ
И ОЧИСТКА МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ПЕЧЕНИ БЫКА

Ж. И. АКОПЯН

Моноаминоксидазную активность в ходе очистки фер-мента определяли колориметрическим методом по ско-рости дезаминирования п-нитрофенилэтиламина. За еди-ницу активности (ед.) фермента принято его количество, катализирующее освобождение 1 нмоля аммиака за ми-нуту при 37 °С в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4).

Реактивы

Бензиламин (основание; Шосткинский завод хим. ре-активов).

50 мМ раствор п-нитрофенилэтиламина·HCl (Мос-ковский завод им. Войкова): приготавливают растворе-нием 101 мг препарата в 10мл воды.

0,2 М К-фосфатный буфер (рН 7,4).

25 % водный раствор неионного детергента тритона X-100 (Т. Шухардт, ФРГ).

0,25 М раствор сахарозы.

Сульфат аммония (перекристаллизированный).

5 % раствор аммиака.

Гель гидроокиси алюминия $\text{С}_{\text{в}}$ получают по прописи: 22 г сульфата аммония растворяют в 500 мл воды при 63°C , добавляют 100 мл 10 % раствора аммиака. Смесь быстро подогревают до 50°C и к ней приливают в один прием при сильном перемешивании турбинной мешалкой 150 мл нагретого до 58°C водного раствора, содержащего 76,7 г алюмоаммиачных квасцов. Температура при этом повышается до 61°C . Через 10 мин осадок быстро отделяют от раствора центрифугированием, промывают 5 раз, взбалтывая каждый раз с 1,5 л воды и удаляя промывную жидкость центрифугированием. После 6-го центрифугирования надосадочная жидкость остается мутной. После двухнедельного хранения ее при комнатной температуре образуется белый хлопьевидный осадок, который и представляет собой гель гидроокиси алюминия $\text{С}_{\text{в}}$.

Свежую ткань печени быка сохраняют в замороженном состоянии при -20°C , в течение 3—4 нед она может быть использована для выделения митохондрий.

Очистка фермента

Получение гомогената

Замороженную печень быка оставляют на 3—4 ч при комнатной температуре до полного оттаивания и гомогенизируют с 10-кратным объемом 0,25 М раствора сахарозы в гомогенизаторе типа Уоринга. Митохондрии выделяют методом дифференциального центрифугирования с последующим промыванием осадка бидистиллированной водой.

Солюбилизация

К водной суспензии митохондрий (рН 6,0—6,2) с содержанием белка около 20 мг/мл добавляют при постоянном перемешивании магнитной мешалкой (и одновременным определении величины рН при помощи потенциометра) бензиламин (основание) до конечной 5 мМ

концентрации (рН суспензии возрастает при этом до 8,2—8,3) и 25% водный раствор тритона X-100 до конечной 0,75% концентрации. Суспензию центрифугируют 40 мин при 100 000 g. Осадок отбрасывают. Надосадочная фракция содержит от 75 до 95% моноаминоксидазной активности суспензии митохондрий.

Фракционирование сульфатом аммония

К полученной надосадочной фракции добавляют при постоянном перемешивании и контролировании величины рН кристаллический сульфат аммония до насыщения 0,20. Величину рН 8,2 поддерживают постоянной путем добавления 5% раствора аммиака. Материал оставляют на 30 мин при -20°C и на 90 мин при $+4^{\circ}\text{C}$, затем центрифугируют при 20 000 g в течение 10 мин и осадок отбрасывают. К надосадочной фракции добавляют сульфат аммония до насыщения 0,40; материал оставляют на 30 мин при -20°C , затем на 90 мин при $+4^{\circ}\text{C}$. Центрифугируют при 20 000 g 10 мин, всплывший осадок суспендируют в небольшом объеме 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4), диализуют против 1 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) до полного освобождения от ионов аммония. Добавляют тритон X-100 до конечной 0,75% концентрации, центрифугируют при 25 000 g в течение 30 мин и осадок отбрасывают.

Обработка гелем гидроокиси алюминия C_β

К надосадочной фракции прибавляют суспензию геля гидроокиси алюминия C_β таким образом, чтобы отношение содержания белка во фракции к сухой массе геля было равным 3:1. После 40-минутного перемешивания центрифугируют при 10 000 g 5 мин. Осадок отбрасывают.

Осаждение сульфатом аммония

К надосадочной фракции добавляют сульфат аммония до насыщения 0,40, поддерживая величину рН в пределах 7,2—7,4. Материал оставляют на 30 мин при -20°C и на 90 мин при $+4^{\circ}\text{C}$, центрифугируют при 20 000 g 10 мин. Всплывший осадок растворяют в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,4). Раствор, содержащий 1,0—

Очистка моноаминоксидазы печени быка
(пример опыта; Ж. И. Акопян и др., 1972*)

Этап очистки	Характеристика фракций						
	объем, мл	активность, ед/мл	общая активность, ед	содержание белка, мг/мл	удельная активность, ед/мг	выход, %	степень очистки
Гомогенат	800	33,8	27040	26	1,3	100	1
Выделение митохондрий	75	130,2	9765	21	6,2	36	5,0
Солюбилизация	68	116,8	7932	16	7,3	29	5,8
Фракционирование сульфатом аммония	45	89,7	4036	6,5	13,8	15	11,0
Обработка гелем гидроокиси алюминия C_β	48	54,7	2625	1,1	49,8	9,5	39,5
Осаждение сульфатом аммония	8	39,8	318	0,4	99,6	1,2	79,0
Повторная обработка гелем гидроокиси алюминия C_β	6	38,3	229	0,12	319	0,9	253,5

1,5 мг белка в мл, диализуют против 1 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) до полного удаления ионов аммония. Диализат центрифугируют при 25 000 g в течение 30 мин и осадок отбрасывают.

**Повторная обработка гелем
гидроокиси алюминия C_β**

К надосадочной фракции прибавляют гель гидроокиси алюминия C_β так, чтобы отношение белка к гелю было 1:1. Перемешивают 40 мин, центрифугируют (10 000 g, 5 мин). Осадок отбрасывают. Надосадочная фракция, представляющая собой очищенный фермент, содержит около 1% моноаминоксидазной активности исходного гомогената (табл. 4). Концентрация детергента тритона X-100 в растворах очищенных ферментных препаратов составляет 0,5—1,0%.

Свойства ферментного препарата

Стабильность. Фермент стабилен в течение 72—96 ч при 4 °С, теряет 50% активности при нагревании до 50 °С в течение 5 мин.

Чистота препарата. На электрофореграмме препарата фермента в полиакриламидном геле, содержащем тритон X-100, обнаружена лишь одна белковая зона. Эта фракция обладает моноаминоксидазной активностью (субстрат — триптамин).

Относительная молекулярная масса (молекулярный вес), определенная при помощи хроматографии в тонком слое сефадекса G-200, равна 264 000.

Константа Михаэлиса. Величина K_m , определенная графически методом двойных обратных величин, составляет $3,2 \cdot 10^{-3}$ М (субстрат — тирамин).

Оптимум рН. Максимальные величины скорости реакции дезаминирования тирамина наблюдаются при рН 9,0.

СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ УЛЬТРАЗВУКОВЫМИ ВОЛНАМИ В СОЧЕТАНИИ С ДЕЙСТВИЕМ НЕИОННОГО ДЕТЕРГЕНТА И ОЧИСТКА МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

И. С. СЕВЕРИНА

Активность моноаминоксидазы (МАО) в ходе очистки определяли колориметрическим методом, основанным на измерении скорости дезаминирования п-нитро-β-фенилэтиламина (Л. В. Брусова и др., 1965). Использовали реактивы: 50 мМ раствор п-нитро-β-фенилэтиламина; 0,2 М фосфатный буфер (рН 7,4); 25% водный раствор неионного детергента тритона X-100 («Koch-Light», Англия).

Ход определения описан ранее (В. З. Горкин и др., 1968)*. Фотометрирование при 450 нм.

Все операции по очистке фермента проводят при 4 °С.

Выделение митохондрий

Митохондрии выделяют из 10% гомогената печени крысы в 0,25 М растворе сахарозы, предварительно отделив ядра и обрывки клеток (В. З. Горкин и др.,

1968)*, центрифугируют на холоду при 8500 g 20 мин. Осадок митохондрий промывают 0,01 М К-фосфатным буфером (рН 7,4) для удаления части растворимых балластных белков и снова центрифугируют при 8500 g в течение 15 мин.

Получение митохондриальных мембран

Осадок митохондрий суспендируют в бидистиллированной воде до содержания белка 25—30 мг/мл и сохраняют при -20°C . После оттаивания суспензию разводят 0,0075 М К-фосфатным буфером (рН 7,4) до концентрации белка 2,5—3,0 мг/мл и центрифугируют при 25 000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость, содержащую значительное количество балластных белков (до 35% от общего содержания белка митохондрий), отбрасывают. Осадок, представляющий собой мембраны митохондрий, суспендируют в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,4) в стеклянном гомогенизаторе Поттера—Эльвегейма до концентрации белка 10 мг/мл. Получение митохондриальных мембран сопровождается примерно двукратным увеличением удельной активности по сравнению с исходной суспензией митохондрий (табл. 5, стадия 1).

Солюбилизация

К полученной суспензии митохондриальных мембран добавляют бензиламин·HCl до конечной 3 мМ концентрации и суспензию подвергают действию ультразвука при помощи дезинтегратора УЗДН-1 (Харьковский завод) при 35 кГц при 8°C в течение 6—10 мин. Сразу после окончания воздействия ультразвуком суспензию переливают в охлажденную ступку и по каплям, при тщательном перемешивании пестиком, добавляют 30% водный раствор неионного детергента тритона X-100 до конечной 1,5% концентрации. После стояния в течение $1\frac{1}{2}$ ч при комнатной температуре суспензию центрифугируют при 4°C (160 000 g, 100 мин). Полученный солюбилизованный раствор фермента желто-коричневого цвета содержит 70% активности, имевшейся в митохондриях. Процедура солюбилизации сопровождается, как правило, только очень незначительной очисткой, примерно в 1,2 раза (см. табл. 5, стадия 2).

Негативная адсорбция на геле гидроокиси алюминия C_{γ}

Адсорбцию солюбилизированного препарата МАО на гидроокиси алюминия осуществляют из 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,4). Суспензию геля (13 мг сухой массы на 1 мл) добавляют к солюбилизированному препарату фермента таким образом, чтобы отношение белка к гелю равнялось 1 : 2. В этих условиях адсорбируются балластные белки. После перемешивания при 4 °С в течение 15 мин смесь центрифугируют при 8000 g 5 мин и осадок отбрасывают. Надосадочная жидкость (рН 7,4) содержит 70—80% моноаминоксидазной активности, присутствующей в солюбилизированном препарате фермента.

Осаждение сульфатом аммония

К полученной надосадочной жидкости добавляют небольшими порциями тонко измельченный, перекристаллизованный сульфат аммония до 0,30 насыщения. Осаждение ведут при интенсивном перемешивании магнитной мешалкой, по возможности предотвращая образование пены, при 0 °С и рН 7,3—7,7. Величину рН поддерживают в указанных пределах добавлением по каплям 5% водного раствора аммиака. Образовавшийся флотирующий осадок после стояния в течение 1 ч при 3 °С отделяют центрифугированием (30 000 g 45 мин), растворяют в минимальном количестве 5 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) и подвергают диализу против того же буфера, содержащего $1 \cdot 10^{-5}$ М 2-меркаптоэтанол. Полученный диализат подвергают очистке на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой (см. табл. 5, 5-й и 6-й этапы).

Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе

Первую колонку (3·18 см) уравнивают 0,03 М фосфатным буфером (рН 7,4)*. Диализат, доведенный до тех же значений солевой концентрации и рН (0,03 М и рН 7,46) и содержащий примерно 2,3% тритона X-100,

* При хроматографии на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой все буферные растворы содержали 2-меркаптоэтанол в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М.

помещают на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. В этих условиях происходит адсорбция балластных белков; выход составляет до 80% начальной активности.

Фракции с достаточно высокой удельной активностью объединяют и диализуют против 10 л 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,46) в течение ночи. Полученный диализат, содержащий 2% тритона X-100, помещают на вторую колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1,5×12 см), уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером (рН 7,46). Фермент элюируют 0,05 М фосфатным буфером (рН 7,35), содержащим 0,4% тритона X-100.

Фракции с наиболее высокой активностью объединяют. Удельная активность элюата, полученного на этой стадии, обычно превышала удельную активность суспензии митохондрий примерно в 50 раз.

Если же на этой стадии была достигнута меньшая степень очистки, объединенный элюат в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,35) после его концентрирования до содержания 1,2—1,5% тритона X-100 диализовали против 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,46). Полученный диализат вновь помещали на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером (рН 7,46). Элюировать фермент можно было как в описанных выше условиях, так и используя 0,1 М фосфатный буфер, содержащий 0,2% тритона X-100. На этой стадии достигали очистки фермента еще в 1,5—1,8 раза.

Выход ферментного препарата составлял 9—10%, удельная активность его превышала примерно в 50 раз удельную активность митохондрий. В препарате МАО содержалось 0,2—0,4% тритона X-100. Результаты типичного опыта по очистке МАО представлены в табл. 5.

Зональный электрофорез

При электрофорезе полученного ферментного препарата в полиакриламидном геле (5% гель, 0,1 М трис-глициновый буфер, рН 9,3, в течение 90 мин) были обнаружены четыре белковые фракции, одна из которых остается на линии нанесения. Каждая из фракций обладала моноаминоксидазной активностью при использовании триптамина в качестве субстрата (Glennep e. a., 1957).

Очистка моноаминоксидазы из печени крысы (пример опыта)

Этап очистки	Характеристика фракций						
	общая актив- ность, ед	общий белок, мг	активность, ед*/мл	концентрация белка, мг/мл	удельная ак- тивность, ед/мг	степень очи- стки	выход, %
Суспензия мито- хондрий	9500	2100	13,3	3,0	4,4	1,0	100
1-й. Суспензия ми- тохондриальных мембран	9790	1200	110	13,7	8	1,8	
2-й. Солюбилиза- ция	6700	637	71,6	6,5	11	2,2	70
3-й. Супернатант после осаждения на геле гидро- окси алюминия Су	6437	309	66	3,15	21	4,7	67
4-й. Осаждение сульфатом аммо- ния 0,3 насыще- ния	5156	210	151	6,2	24,4	5,5	54
5-й. 1-я адсорбция на ДЭАЭ-целлю- лозе	3350	55	101	1,65	61	14	35
6-й. 2-я адсорбция на ДЭАЭ-целлю- лозе	900	4,1	70	0,32	220	50	9

* За единицу активности фермента принято его количество, катализирующее освобождение 1 нмоля аммиака за 1 мин при 37 °С в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4).

СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ ПРИ ПОМОЩИ МЕТИЛЭТИЛКЕТОНА И ОЧИСТКА МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ

И. С. СЕВЕРИНА

Для освобождения фермента из связанного с мембраной митохондрий состояния использовали метод Холлунгера и Ореланда (Hollunger, Oreland, 1970). Метод основан на двукратной экстракции фосфолипидов митохондрий метилэтилкетонном в присутствии сульфата аммония с последующим извлечением фермента фосфат-

ным буфером. Дальнейшую очистку полученных растворимых препаратов осуществляли по модифицированному нами методу Ореланда (Oreland, 1971).

Определение активности

Активность митохондриальной моноаминоксидазы (МАО) в ходе очистки измеряли спектрофотометрическим методом при 250 нм (Tabor *et al.*, 1954) с бензиламином в качестве субстрата.

Метод основан на измерении скорости образования бензальдегида из бензиламина.

Реактивы: 0,1 М раствор дважды перекристаллизованного бензиламина·HCl (Харьковский завод); 0,2 М фосфатный буфер (pH 7,2).

Ход определения — см. В. З. Горкин и соавт. (1968)*.

За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое вызывает изменение в оптической плотности при 250 нм (кювета с ходом луча 1 см) на 0,001 за 1 мин при 24 °С. Анализируемая проба объемом 3 мл содержит 10 мкмоль бензиламина в 0,2 М фосфатном буфере (pH 7,2).

Очистка

Получение фрагментов митохондрий

Печень свиньи получают с бойни и начинают обработку по возможности не позже чем через час после забоя животного. 96 г печени, взятых от одного животного (одновременно обрабатывают 3 таких порции), измельчают на холоду и 2 мин гомогенизируют в гомогенизаторе Уоринга в 0,25 М растворе сахарозы. Объем гомогената доводят до 960 мл и центрифугируют 5 мин при 1000 g для удаления ядер и обрывков клеток. Надосадочную жидкость фильтруют через 4 слоя марли, объем доводят до 940 мл 0,25 М раствором сахарозы и центрифугируют 45 мин при 13 000 g для осаждения митохондрий. Митохондрии суспендируют в 146 мл бидистиллированной воды в гомогенизаторе Поттера — Эльвегейма и центрифугируют 15 мин при 100 000 g. Осадок митохондрий вновь суспендируют в том же объеме бидистиллированной воды и вновь центрифугируют (100 000 g, 15 мин). Лизированные митохондрии суспендируют в би-

дистиллированной воде до концентрации белка примерно 50 мг/мл и оставляют стоять в холодной комнате (при 2—3 °С) в течение 2 дней.

С о л ю б и л и з а ц и я м о н о а м и н о к с и д а з ы

Все операции проводят в холодной комнате при 2—3 °С. Для предупреждения возможной инактивации фермента при использовании больших количеств метилэтилкетона 180 мл полученной суспензии лизированных митохондрий солюбилизируют порциями по 60 мл. В стакан емкостью 1 л помещают 60 мл суспензии лизированных митохондрий и добавляют порциями по 8—9 объемов метилэтилкетона (500 мл) при интенсивном перемешивании магнитной мешалкой в течение 6 мин. После образования осадка митохондрий надосадочную жидкость декантируют и отбрасывают. Пары метилэтилкетона удаляют пропусканием струи сжатого воздуха в течение 6—10 мин. Осадок митохондрий суспендируют в 200 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,2), содержащего ЭДТА в 1 мМ концентрации, и перемешивают магнитной мешалкой в течение 5 мин. После центрифугирования в продолжение 10 мин при 30 000 g надосадочную жидкость (1-й буферный экстракт) отбрасывают. Осадок суспендируют в 120 мл 0,05 М раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, добавляют при интенсивном перемешивании магнитной мешалкой 11 объемов метилэтилкетона и экстрагируют 6 мин. После оседания митохондрий надосадочную жидкость сливают, пары метилэтилкетона удаляют пропусканием струи сжатого воздуха (10 мин) и осадок экстрагируют 100 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,2) в течение 10 мин, как указано выше. После центрифугирования в продолжение 10 мин при 30 000 g получают второй буферный экстракт, окрашенный в желтый цвет и содержащий до 50—60% активности МАО митохондрий. Процесс солюбилизации сопровождается одновременной очисткой примерно в 30—35 раз (табл. 5, 1-й этап).

О с а ж д е н и е к и с л о т о й

К раствору МАО, содержащему от 0,7 до 1,0 мг белка в мл, при интенсивном перемешивании магнитной мешалкой на холоду добавляют по каплям 1 М раствор

уксусной кислоты до pH 4,5. Образовавшийся осадок, содержащий до 80% активности МАО в исходном растворе, быстро отделяют центрифугированием (30 000 g, 10 мин) и растворяют в минимальном количестве 0,1 М раствора K_2HPO_4 , содержащего 1 мМ ЭДТА. pH раствора доводят до 7,5.

Гельфльтрация на сефадексе G-200

Полученный раствор, окрашенный в интенсивно желтый цвет, наносят на колонку (3×80 см) с сефадексом G-200, уравновешенным 0,1 М фосфатным буфером (pH 7,2), содержащим 1 мМ ЭДТА. Фермент элюируют тем же буфером со скоростью около 8 мл в час.

Фракционированное осаждение кислотой

Полученный элюат подкисляют 1 М раствором уксусной кислоты, добавляя ее по каплям до pH 5,75 при перемешивании. Осадок, обладающий незначительной активностью, отделяют центрифугированием при 30 000 g в течение 10 мин и отбрасывают. К надосадочной жидкости снова добавляют 1 М раствор уксусной кислоты до pH 4,5. Образовавшийся осадок быстро отделяют центрифугированием (30 000 g, 10 мин) и растворяют в минимальном количестве 0,1 М раствора K_2HPO_4 , не содержащего ЭДТА. Раствор нейтрализуют до pH 7,5.

Удельная активность полученного на этой стадии ферментного препарата почти в 400 раз превышает удельную активность МАО в гомогенате. Выход фермента (по общей активности) составляет 25% от активности митохондрий. Результаты типичного опыта по очистке фермента представлены в табл. 6.

Чистота препарата

О чистоте препарата судили по количеству молей флавинадениндинуклеотида (ФАД), приходящихся на 1 моль фермента, в расчете на относительную молекулярную массу МАО, равную 115 000 (по данным Ogeland, 1971).

Содержание ФАД в очищенных препаратах МАО из печени свиньи определяли спектрофотометрически по разности в оптической плотности при 455 нм раствора

Таблица 6

Очистка моноаминоксидазы печени свиньи (пример опыта)

Этап очистки	Характеристика фракций						
	общая актив- ность, ед	общий белок, мг	активность, ед./мл	концентрация белка, мг/мл	удельная ак- тивность, ед/мг	степень очист- ки	выход, %
Митохондрии	226000	7300	1200	41	29	1,8*	100
Солюбилизация	114000	210	380	0,7	540	34	50
1-е осаждение кис- лотой (рН 4,5)	97500	37,7	15000	5,8	2620	162	43
Гельфильтрация на сефадексе G-200	83850	15,4	4300	0,8	5375	333	37
2-е осаждение кис- лотой (рН 4,5)	60000	9,6	20000	3,2	6250	396	26

* Удельная активность митохондрий почти в 2 раза выше удельной активности гомогената печени.

ферментного препарата, содержащего 1,92 мг белка в 3 мл, до и после добавления дитионита ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Содержание ФАД рассчитывали по формуле $D = \epsilon \cdot l \cdot c$, где D — разность экстинкций при 455 нм; ϵ — коэффициент молярной экстинкции ФАД; l — длина хода луча в кювете, равной 1 см; c — молярная концентрация ФАД.

Препарат фермента с удельной активностью 6200 ед. содержал 1 моль ФАД на 123 000 г белка.

**ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
ОДЕНИЛАТДЕЗАМИНАЗ**

В. А. ПЕККЕЛЬ, Ж. И. АКОПЯН

Аденилатдезаминаза (5'-АМФ-аминогидролаза, КФ 3.5.4.6) катализирует дезаминирование адениловой кислоты по следующей схеме:



ПРИНЦИП МЕТОДА

Потенциометрический метод определения активности аденилатдезаминаз основан на косвенном измерении ко-

личества аммиака. Выделившийся в результате ферментативной реакции аммиак при $pH \leq (pK_{NH_4^+} - 1) \leq 8,13$ полностью ионизируется, т. е. связывает протон в отношении 1 : 1. Измеряя уменьшение концентрации протонов в инкубационной среде (ΔpH), можно судить о количестве образовавшегося аммиака. Соотношение между ΔpH и количеством аммиака определяется буферной емкостью среды. Удельную активность аденилатдезаминазы вычисляют по следующей формуле:

$$\text{удельная активность} = \frac{\Delta pH}{t \cdot E} \cdot \beta,$$

где ΔpH — изменение pH в ходе реакции; t — время реакции (мин); E — количество белка (мг); β — буферная емкость полной инкубационной среды.

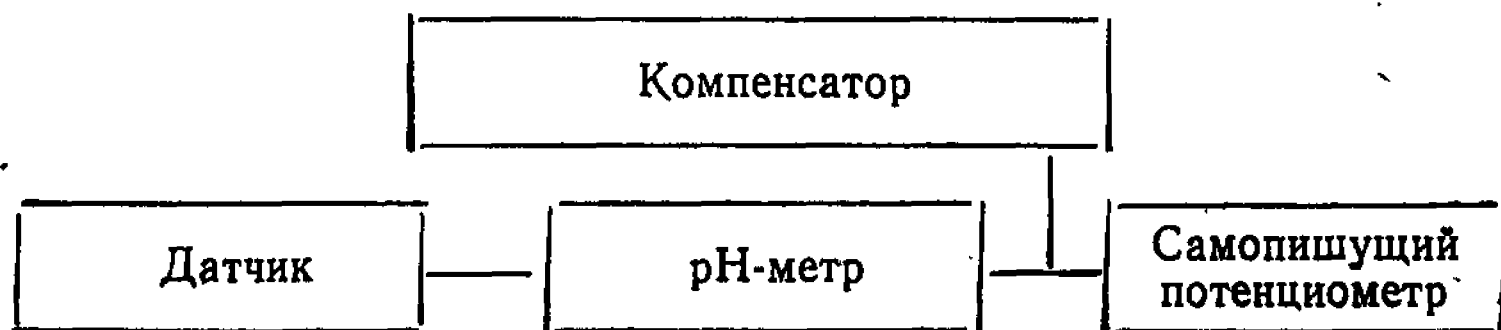
РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Двунариевая соль АМФ («Reanal», Венгрия).

0,45 М раствор KCl.

Бычий сывороточный альбумин («Koch-Light», Англия).

Блок-схема установки для регистрации изменений pH при ферментативных реакциях представлена ниже. В ка-



честве датчика может быть применена любая пара электродов для измерения pH , например стеклянный (ЭСЛ-43-07) и хлоросеребряный (ЭВМ-1МЗ, Гомельского завода измерительных приборов). Из отечественных pH -метров наиболее удобен лабораторный pH -метр рН-262 того же завода. Компенсатор служит для изменения чувствительности и диапазонов измерения самопишущего потенциометра КСП-4 (собственные пределы измерения 0—20 мВ).

ИЗМЕРЕНИЕ БУФЕРНОЙ ЕМКОСТИ

Теоретически буферная емкость (β) определяется в какой-либо точке шкалы pH и представляет собой величину, равную:

$$\beta = \frac{dx}{d \text{pH}}.$$

где dx — количество добавленного основания; $d \text{pH}$ — соответствующее изменение pH. Однако можно допустить, что в узком интервале pH буферная емкость растворов фермента, субстрата и хлорида калия (фон) постоянна, и определять β для некоторого рабочего диапазона pH. Измеряют β титрованным 5 мМ раствором КОН, добавляя его из туберкулинового шприца с помощью микровинта или синхронного двигателя ДСД-2. Измерить β полной инкубационной среды невозможно, так как в ней будет происходить реакция с изменением pH. В связи с этим титруют каждый компонент среды отдельно, а буферную емкость смеси вычисляют по формуле: $\beta = \beta_f + \beta_E + \beta_S$, где β_f , β_E и β_S — буферные емкости фона, фермента и субстрата соответственно.

При определении β_E вместо аденилатдезаминазы, изоэлектрическая точка которой находится при pH 5,6, можно использовать бычий сывороточный альбумин (БСА), имеющий близкую величину изоэлектрической точки — 4,95. В интервале концентраций АМФ от 50 до 2000 мкмоль и БСА от 50 до 400 мкг/мл β растет прямо пропорционально увеличению концентрации. Это позволяет найти «удельную буферную емкость» для каждого компонента инкубационной среды (β') и определять β по формуле: $\beta = \beta_f + \beta'_E \cdot E + \beta'_S \cdot S$, где E и S — количества фермента и субстрата, внесенные в пробу.

В интервале pH 6,60—7,00 мы получили $\beta_{\text{АМФ}}^1 = 0,386$ мкмоль/рН, мкмоль АМФ, $\beta_{\text{БСА}}^1 = 0,098$ мкмоль/рН, мг БСА. Если проводить реакцию в 6 мл 0,45 М КСl (такая концентрация хлорида калия необходима для предотвращения диссоциации фермента), то $\beta_f = 0,356$ мкмоль/рН.

Пример опыта. Приготавливают компоненты инкубационной смеси:

- 1) 60 мМ раствор АМФ в 0,45 М КСl (pH 6,6);
- 2) 0,45 М раствор КСl;
- 3) митохондрии печени крысы в 0,45 М КСl (содержание белка 23 мг/мл).

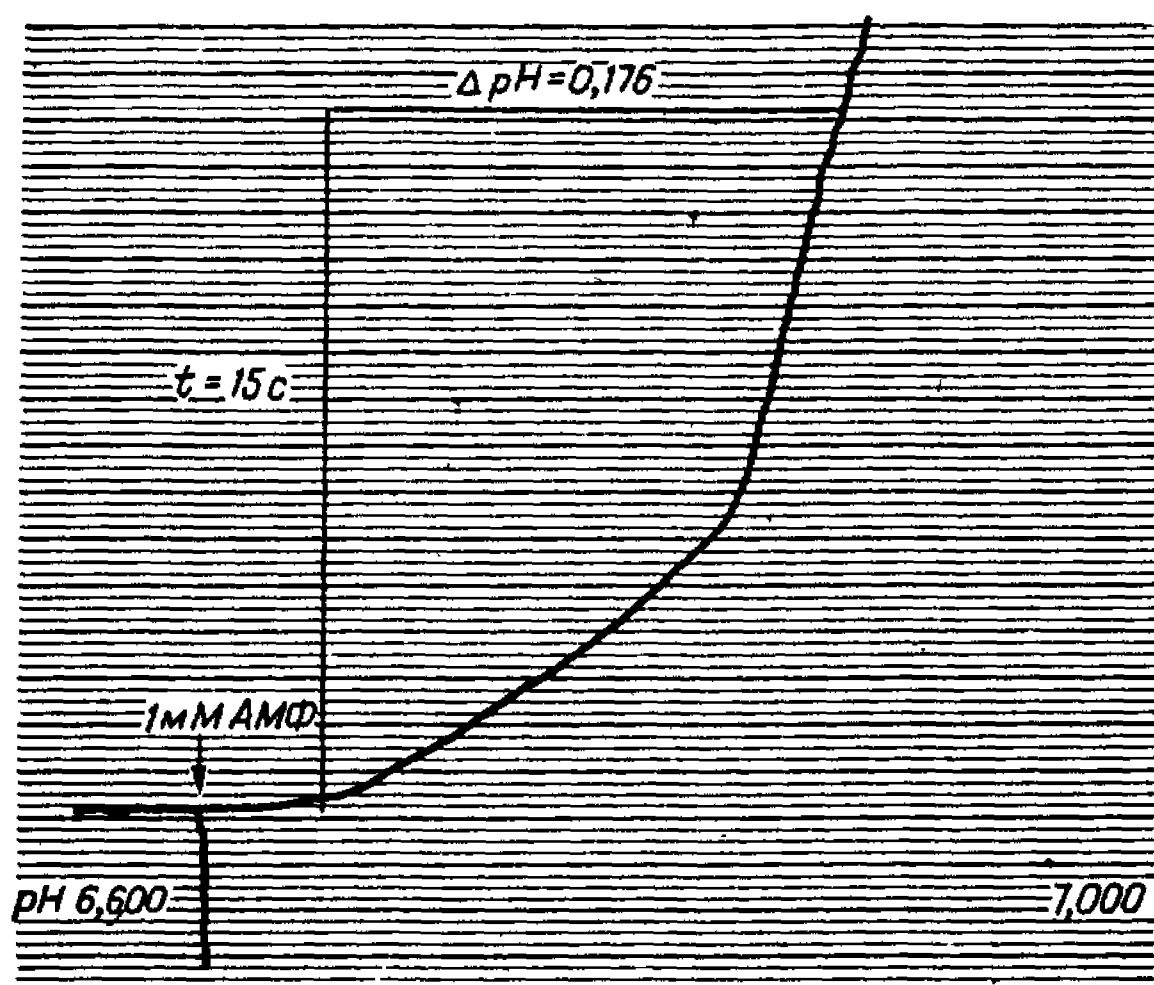


Рис. 3. Запись реакции дезаминирования АМФ митохондриями печени крысы. Инкубационная среда состояла из 6 мкмоль АМФ, митохондрий печени крысы (46 мг белка) в 6 мл 0,45 м раствора КСl. Реакцию проводили при комнатной температуре (23 °С). Митохондрии получали по методу Шнайдера (Schneider, 1948), белок определяли по методу Лоури (Lowry, 1951).

В кювету объемом 20 мл вносят 2 мл взвеси митохондрий, 3,9 мл 0,45 М раствора КСl и 0,1 мл 60 мМ раствора АМФ. Смесь быстро перемешивают и начинают измерения и запись рН. Учитывая изменение рН среды, время реакции и буферную емкость инкубационной смеси, рассчитывают скорость реакции и удельную активность фермента. На рис. 3 приведен пример записи реакции дезаминирования адениловой кислоты (АМФ) митохондриями печени крысы. Удельная активность аденилатдезаминазы, рассчитанная по кривой за первые 15 мин реакции, равна 1,8 нмоля NH_3 на мг белка в 1 мин. Активность, измеренная в этой же пробе путем определения аммиака методом Конвея, составила 1,6 нмоля NH_3 на мг белка в 1 мин. При сравнении результатов потенциометрического метода со спектрографическим (Kalkar, 1947) было получено полное совпадение.

ОЧИСТКА АДЕНИЛАТДЕЗАМИНАЗЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРЫСЫ

Ж. И. АКОПЯН, А. З. КИРКЕЛЬ

В методе очистки использовано свойство аденилатдезаминазы избирательно адсорбироваться на фосфате целлюлозы. Последующие простые приемы позволяют

получить высокоочищенные препараты фермента (Smiley e. a., 1967)*.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА

Определение активности аденилатдезаминазы, КФ 3.5.4.6, основано на реакции: $\text{АМФ} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ИМФ} + \text{NH}_3$. Его проводят спектрофотометрическим методом (Kalkar, 1947), измеряя прирост оптической плотности при 285 нм. Коэффициент молярной экстинкции при этой длине волны для АМФ равен 480, для ИМФ — 730. Следовательно, при увеличении оптической плотности на 0,250 ($\Delta D = 0,730 - 0,480 = 0,250$) из 1 ммоль АМФ образуется 1 ммоль ИМФ в 1 л (или из 1 мкмоль АМФ — 1 мкмоль ИМФ в 1 мл).

Реакцию проводят в пробе объемом 3 мл (ход луча в кювете 10 мм). Таким образом, если в пробе образуется 1 мкмоль ИМФ, то увеличение оптической плотности при 285 нм составит 0,083 ($0,250 : 3$).

За единицу активности (ед.) фермента принимают его количество, катализирующее образование 1 мкмоль ИМФ за минуту при комнатной температуре в 0,05 М имидазол-НСI буфере (pH 6,5).

Реактивы и материалы

Двунариевая соль АМФ («Reanal», Венгрия).

Экстрагирующий буфер — 0,18 М KCl, 0,054 М KH_2PO_4 , 0,035 М K_2HPO_4 (pH 6,5).

0,45 и 1 М растворы KCl (pH 7,0). Фосфат целлюлозы, тип Р-11 («Ватман», Англия).

Для значительного увеличения адсорбционных свойств фосфата целлюлозы перед использованием проводили его дополнительную обработку (Peterson, 1970).

К 50 г целлюлозы при перемешивании добавляют раствор 75 г NaOH в 185 мл воды. Вязкую массу выдерживают в ледяной бане 30 мин, затем к ней, перемешивая и продолжая охлаждать, медленно добавляют 330 мл H_2O . Спустя 15 мин по каплям (примерно в течение 50 мин) добавляют 80 мл эфирного раствора хлорангидрида фосфора POCl_3 , поддерживая температуру суспензии 25—30 °С. Конечное значение pH должно составлять приблизительно 6,0. Через несколько минут суспензию разводят водой до 2 л в большом кристаллизаторе и ос-

тавляют на ночь. Осадок промывают с повторными декантациями до полной прозрачности надосадочной жидкости. Осадок фильтруют, промывают 96% этанолом, высушивают. Продукт представляет собой белый порошок с массой около 30 г, который содержит 1,9% фосфата, т. е. 0,6 ммоль фосфора на г.

Используют свежие скелетные мышцы крыс-самцов.

ОЧИСТКА ФЕРМЕНТА

Получение гомогената

100 г свежей мышечной ткани гомогенизируют в 330 мл экстрагирующего буфера в гомогенизаторе типа Уоринга сначала 5 мин при 8000 об/мин, а затем 25 мин при 4000 об/мин при комнатной температуре. Центрифугируют при 14 000 g в течение 30 мин при охлаждении. Осадок отбрасывают. Надосадочную фракцию фильтруют через 3 слоя марли.

Обработка надосадочной фракции

К полученной надосадочной фракции прибавляют 1,25 г фосфата целлюлозы (сухая масса) и при медленном перемешивании магнитной мешалкой выдерживают 30 мин. При этом на фосфате целлюлозы адсорбируется около 90% общей аденилатдезаминазной активности. После отстаивания надосадочную жидкость сливают, фосфат целлюлозы переносят на воронку со стеклянным фильтром (№ 2—3) и для удаления части балластного белка промывают 330 мл (порциями по 80—100 мл) экстрагирующего буфера с легким отсасыванием водоструйным насосом. Затем на той же воронке фосфатцеллюлозы промывают 330 мл (порциями по 80—100 мл) 0,45 М раствором KCl (pH 7,0), содержащим 1 mM 2-меркаптоэтанол. Фосфат целлюлозы снова суспендируют в 0,45 М растворе KCl (pH 7,0) и наносят на колонку (2,5 × 25 см). Адсорбированную на фосфате целлюлозы аденилатдезаминазу элюируют 1 М раствором KCl, содержащим 1 mM 2-меркаптоэтанол. Фермент выходит единой фракцией, соответствующей острому симметричному пику на элюиционной кривой. В этой фракции сосредоточено около 30% общей активности фермента, очищенного в 250—300 раз по сравнению с исходной надосадочной фракцией (табл. 7). Элюцию фермента 1 М раствором

**Очистка аденилатдеаминазы скелетных мышц крысы
(пример опыта)**

Этап очистки	Характеристика фракций						
	объем, мл	активность, ед/мл	общая активность, ед.	содержание белка, мг/мл	удельная активность, ед/мг	степень очистки	выход, %
Надосадочная фракция гомогената	270	14,2	3827	13,5	1,05	1	100
Элюция после адсорбции на фосфате целлюлозы	2,75	432	1188	1,5	288	274	31

КСI можно проводить и на воронке, но в этом случае значительно уменьшается выход общей активности фермента (до 3—5%).

СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА

Стабильность. Фермент стабилен в течение 20—25 дней в 1 М растворе КСI, содержащем 2-меркаптоэтанол в миллимолярной концентрации.

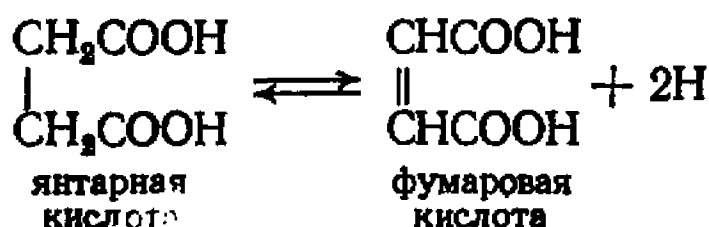
Константа Михаэлиса. Величина K_m , определенная графически методом двойных обратных величин, составляет 1 мМ (субстрат АМФ).

Оптимум рН. Максимальные величины скорости реакции деаминарования адениловой кислоты наблюдались при рН 6,5.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СУСПЕНЗИИ МИТОХОНДРИЙ

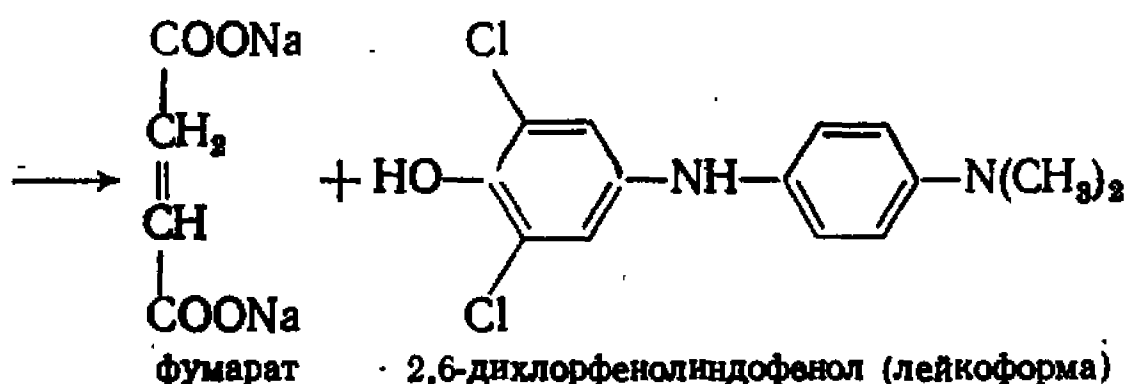
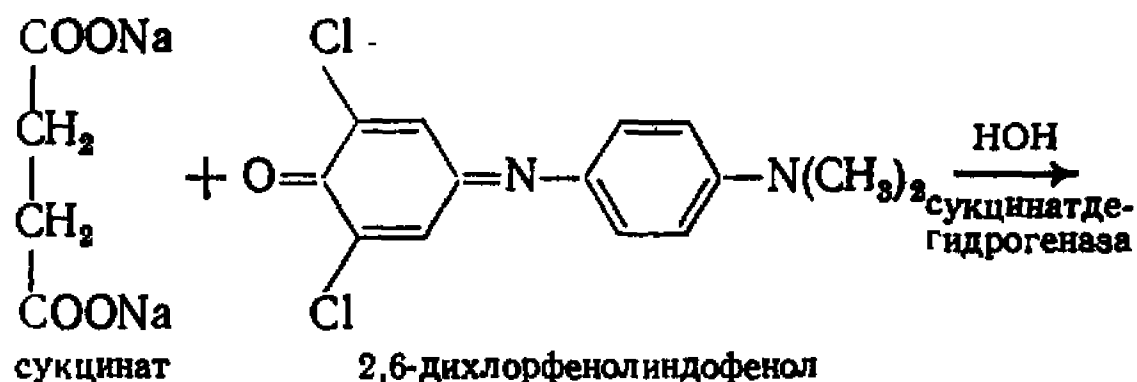
Р. С. КРИВЧЕНКОВА

Сукцинатдегидрогеназа, сукцинат: (акцептор)-оксидоредуктаза, КФ 1.3.99.1, катализирует одну из реакций цикла трикарбоновых кислот по следующему уравнению:



ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения активности сукцинатдегидрогеназы основан на измерении снижения оптической плотности при 600 нм 2,6-дихлорфенолиндофенола, восстанавливающегося в присутствии феназинметасульфата при ферментативном окислении сукцината.



РЕАКТИВЫ

0,5 М раствор сукцината натрия.

0,1 М К—Na-фосфатный буфер (рН 7,4).

0,02 М раствор феназинметасульфата.

0,001 М раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола.

0,05 М раствор цианида калия.

Последние три раствора приготавливают и используют в день опыта.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В пробы (конечный объем 4 мл) вносят 0,3 мл буферного раствора, а затем последовательно по 0,2 мл растворов сукцината натрия, феназинметасульфата, цианида калия и 2,6-дихлорфенолиндофенола. Последний вносят в пробы примерно за 10 мин до определения активности фермента. Не следует заблаговременно смешивать растворы сукцината, феназинметасульфата и 2,6-дихлорфенолиндофенола, так как может произойти неферментативное восстановление последнего. Содержимое пробирки перемешивают и инкубируют в водяной бане

при 37 °С в течение 2—3 мин. Затем в пробирку вносят суспензию митохондрий (0,1—0,2 мг белка в 0,1—0,2 мл буферного раствора), быстро переливают в кювету (длина хода луча 1 см) и на секундомере отмечают время начала реакции. Кювету устанавливают в термостатированный кюветодержатель и измеряют оптическую плотность при 600 нм через каждые 15 с в течение 2 мин при 37 °С. Аналогичным образом измеряют снижение оптической плотности в пробах, не содержащих сукцината («эндогенная активность»). При расчете истинной активности сукцинатдегидрогеназы величины эндогенной активности фермента вычитают из величин, выражающих активность сукцинатдегидрогеназы в пробах, содержащих сукцинат. В контрольные кюветы, против которых измеряют оптическую плотность всех проб, вносят буферный раствор. Измерение активности сукцинатдегидрогеназы в суспензии митохондрий проводят по возможности быстро — в течение 2—3 мин.

Для расчета активности сукцинатдегидрогеназы используют величину снижения оптической плотности (в ходе ферментативной реакции) за 1 мин на 1 мг белка. Активность сукцинатдегидрогеназы выражают в нмолях окисленного сукцината, учитывая, что снижение оптической плотности на 1,0 эквивалентно восстановлению 60 нмолей 2,6-дихлорфенилиндофенола (Cooper, 1967), а количество восстановленного красителя пропорционально количеству окисленного сукцината.

Определение активности сукцинатдегидрогеназы проводили в суспензиях митохондрий печени крысы. Суспензии митохондрий подвергали замораживанию и оттаиванию с последующим отмыванием части балластных белков гипотоническим буферным раствором (0,01 М К—Na-фосфатный буферный раствор, рН 7,4). В таких суспензиях активность сукцинатдегидрогеназы составляла $82,1 \pm 3,5$ нмоля окисленного сукцината за 1 мин на 1 мг белка (В. З. Горкин, Р. С. Кривченкова, 1971).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ В СУСПЕНЗИИ МИТОХОНДРИЙ

Р. С. КРИВЧЕНКОВА

ПРИНЦИП МЕТОДА

Цитохромоксидаза (цитохром с: кислород-оксидоредуктаза, КФ 1.9.3.1) катализирует реакцию: 2 цитохрома $\text{Fe}^{2+} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightleftharpoons 2$ цитохрома $\text{Fe}^{3+} + \text{O}^{2-}$. При инкубировании суспензии митохондрий с цитохромом с и диметил-п-фенилендиамином в результате окисления последнего образуется красный пигмент с максимумом поглощения при 510 нм в количестве, пропорциональном цитохромоксидазной активности митохондрий (Straus, 1956). Образовавшийся пигмент экстрагируют смесью абсолютного спирта с тетрахлорэтиленом в отношении 3:1. В ходе ферментативной реакции восстановленное состояние цитохрома с поддерживается избытком диметил-п-фенилендиамина.

РЕАКТИВЫ

0,04% раствор цитохрома с.

0,4% раствор диметил-п-фенилендиамина гидрохлорида.

Спирт абсолютный.

Тетрахлорэтилен.

Растворы цитохрома с и диметил-п-фенилендиамина готовят в день опыта и помещают в баню со льдом. Абсолютный спирт и тетрахлорэтилен смешивают в отношении 3:1.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В пробирки вносят по 0,2—0,3 мл суспензии митохондрий (например, печени крысы) с содержанием 0,4—0,5 мг белка в 0,01 М К—Na-фосфатном буферном растворе (рН 7,4), по 0,2 мл 0,04% водного раствора цитохрома с и дистиллированную воду до 1 мл. Пробы преинкубируют при 37°C в течение 2 мин, а затем добавляют по 0,1 мл 0,4% раствора диметил-п-фениленди-

амина. На секундомере отмечают время начала реакции и инкубируют пробы в течение 1—3 мин до появления красной окраски. После инкубации пробы охлаждают во льду и образовавшийся окрашенный продукт экстрагируют 4-кратным объемом смеси абсолютного спирта с тетрахлорэтиленом (3:1). Этими растворителями пигмент извлекается полностью при слабокислой реакции среды (рН 5,6—6,0), которая создается в пробе после внесения в нее диметил-п-фенилендиамина гидрохлорида. Перед добавлением экстрагирующей смеси необходимо проверить величину рН в пробе и довести ее в случае необходимости до 5,6—6,0 разбавленной соляной кислотой.

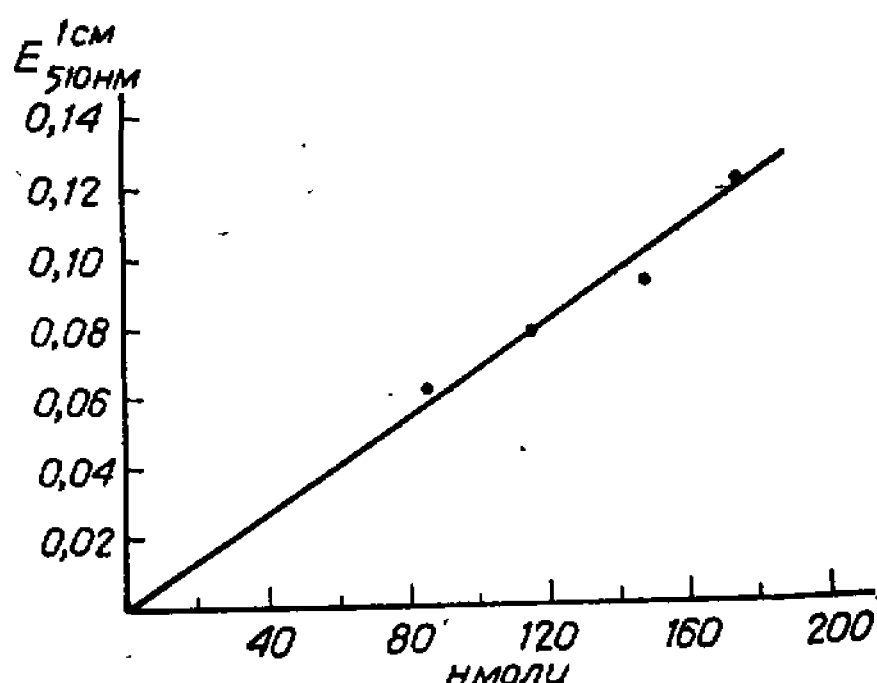
Осадок отделяют центрифугированием. Прозрачную окрашенную надосадочную жидкость осторожно переносят пастеровской пипеткой в сухие пробирки и фотометрируют на спектрофотометре СФ-4 при 510 нм в кюветках (с ходом луча 10 мм) против экстрагирующей смеси. Окраска устойчива в течение 10 мин.

Контрольную пробу готовят аналогичным образом, но после добавления к митохондриям цитохрома с в пробу вносят 1 мл абсолютного спирта для прекращения реакции.

Для того чтобы выразить активность цитохромоксидазы в нмолях окисленного диметил-п-фенилендиамина, строят калибровочную кривую с использованием бихромата калия, в присутствии которого диметил-п-фенилендиамин неферментативно окисляется с образованием красного пигмента. Готовят несколько рядов пробирок, в которые вносят 0,02% раствор бихромата калия (от 0,1 до 0,9 мл в каждый ряд пробирок), калий — натрий-фосфатный буфер по 1 мл и 0,01% раствор диметил-п-фенилендиамина и доводят объем проб до 4 мл водой. В первый ряд пробирок вносят по 0,15 мл 0,01% раствора диметил-п-фенилендиамина, во второй — по 0,20 мл, в третий — по 0,25 мл и в четвертый — по 0,30 мл. Пробы экстрагируют 4 мл смеси абсолютного спирта и тетрахлорэтилена, через 3—5 мин измеряют оптическую плотность проб при 510 нм. Полученные значения оптических плотностей используют для построения калибровочного графика (рис. 4). По нашим данным, оптическая плотность, равная 0,120, соответствует содержанию 174 нмолей окисленного диметил-п-фенилендиамина в пробе 4 мл.

Рис. 4. Калибровочный график для расчета количества окисленного диметил-п-фенилендиамина.

На ординате — оптическая плотность при 510 нм; на абсциссе — количество окисленного диметил-п-фенилендиамина в пробе объемом 4 мл, в наномолях.



При налаживании методики следует строить калибровочный график заново, так как получаемые результаты зависят от имеющихся в распоряжении исследователя реактивов и оптических приборов. При использовании данной методики рис. 4 следует рассматривать только как пример для построения расчетного графика.

В пробах, содержащих суспензию подвергавшихся замораживанию и оттаиванию митохондрий печени крысы, количество окисленного диметил-п-фенилендиамина составило $415,5 \pm 34$ нмоля на 1 мг белка в 1 мин.

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРОСОМНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЕЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

И. И. КАРУЗИНА, А. И. АРЧАКОВ

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОСОМНОЙ ФРАКЦИИ

Детальное изучение мембран цитоплазматической сети* (эндоплазматического ретикулума) стало возможно с момента выделения их в виде микросомной фракции при дифференциальном центрифугировании. Первые исследования с применением этого метода были выполнены в 1948 г. Claude, выделившим мембраны цитоплазматической сети в виде фракции «мелких гранул».

* Наименования клеточных структур приведены в соответствии с Международной гистологической номенклатурой.

В дальнейшем было показано, что фракция медленно седиментирующих субклеточных частиц (микросом) содержит все элементы цитоплазматической сети. Четкая дифференцировка мембран этой субклеточной структуры *in situ* хорошо сохранялась и во фракции (Dallner, Ernster, 1968).

Для получения мембран цитоплазматической сети печени гомогенат ткани центрифугируют первоначально при 10 000—12 000 g в течение 15—20 мин. При этом осаждаются неразрушенные клетки, ядра, митохондрии, большая часть лизосом и пероксисом, крупные пузырьки плазматической мембраны. Последующее центрифугирование надосадочной жидкости при 78 000—100 000 g в течение 60—120 мин приводит к осаждению мембран цитоплазматической сети. Полученный таким образом осадок, названный фракцией микросом, далеко не однороден, и состав его варьирует в зависимости от типа ткани. Например, для печени характерным является наличие подфракций незернистых (гладких) и зернистых (шероховатых) мембран, свободных полирибосом и рибосом. Фракция микросом, выделенная в тех же условиях из поджелудочной железы, содержит, кроме выше-названных компонентов, мембраны пластинчатого комплекса (аппарата Гольджи), фракции из почки и клеток асцитной опухоли — внешнюю плазматическую мембрану, а микросомная фракция мозга — миелиновые фрагменты, плазматическую мембрану и синапсомы (Dallner, Ernster, 1968; Tata, 1969).

Следовательно, термин «микросомы» или «фракция микросом» используется обычно для обозначения фракции наиболее медленно седиментирующих частиц гомогенатов различных тканей вне зависимости от их морфологического состава.

До сих пор не существует стандартного метода выделения этой фракции из различных органов и тканей. Более того, даже при получении микросом из одной и той же ткани всегда следует иметь в виду, с какой целью выделяется фракция. Например, если предполагают изучать редокс-цепи цитоплазматической сети, то основное внимание следует уделить возможным загрязнениям митохондриями. Если предполагают изучать биосинтез белка, то необходимо предпринять все меры предосторожности для того, чтобы не повредить полисомные комплексы и их связь с мембранами.

Процедура выделения

Крыс-самцов (200—250 г) забивали декапитацией. Вскрывали брюшную и грудную полости и в нижнюю полую вену через сердце вводили канюлю. Печень промывали холодным 1,15% раствором KCl или 0,25 М раствором сахарозы (рН 7,4) до светло-желтого цвета. Использование KCl позволяет получить микросомную фракцию с минимальным содержанием балластного сорбированного белка. Сахарозу применяли в тех случаях, когда препараты микросом подвергали дальнейшему фракционированию. Печень удаляли, отжимали на марлевой салфетке, взвешивали и измельчали ножницами. Все процедуры проводили в холодной комнате при 0—4 °С.

Гомогенат приготавливали в гомогенизаторе Даунса с тефлоновым пестиком при отношении массы ткани к объему раствора как 1 : 3 при использовании KCl и 1 : 9 в случае раствора сахарозы. Гомогенизацию проводили в течение 1 мин 20—30 движениями пестика вверх и вниз. Затем гомогенат переносили в пробирки к центрифуге ЦЛР-1 с рабочим объемом 10 мл и центрифугировали при 0 °С в течение 15 мин при 9000 g, если использовали для гомогенизации солевую среду (KCl), и при 10 000 g в течение 20 мин в сахарозной среде. Надосадочную жидкость, не содержащую ядер и митохондрий (постмитохондриальную), подвергали дальнейшему центрифугированию для осаждения мембран цитоплазматической сети. Если в работе применяли центрифужные пробирки с большим объемом (25 или 50 мл) к центрифуге MSE High-Speed-18 (ротор 69181), то условия центрифугирования изменяли: ядра и митохондрии осаждали при 9500 g в течение 20 мин в солевой среде и при 12 500 g в течение 30 мин в сахарозной среде.

Полученную постмитохондриальную жидкость центрифугировали в ультрацентрифуге ВАК-60 (ротор 684, 8·35 мл) или ВАК-601 (ротор 2329, 8·35 мл) или Хитачи 65Р (ротор RP30 553, 12·35 мл) при 105 000 g в течение 60 мин в солевой среде и 90 мин — в сахарозной. Осадок мембран цитоплазматической сети суспендировали в соответствующей среде выделения из расчета, что 1 мл среды на 1 г сырой массы печени дает суспензию микросомной фракции с содержанием белка около 10 мг в 1 мл.

Оценка чистоты

Для количественной оценки эффективности способа выделения субклеточных структур можно использовать метод, предложенный А. И. Арчаковым и соавторами (1973)*. Суть его заключается в следующем. Определив общую активность индикаторных ферментов мембран цитоплазматической сети в исходном гомогенате и полученном препарате (активность ферментов рассчитывают на общее количество белка гомогената или фракции), можно легко рассчитать выход микросомной фракции в процентах от содержания ее в гомогенате. Измеряя удельную активность индикаторных ферментов цитоплазматической сети (выделяемая структура) и загрязняющих препарат структур (митохондрий, лизосом, пероксисом) в гомогенате и изолированном препарате микросом, можно рассчитать степень очистки фракции по формуле:

$$b = \frac{k_s \cdot 100}{k_m} \%,$$

где k_m — максимально возможная (100%) степень очистки фракции, которая вычисляется на основании процентного содержания белка в той или иной фракции гомогената и составляет в печени: для митохондрий 5 (белок 20%), для микросом 5 (белок 20%), для лизосом 50 (белок 2%) и для пероксисом 40 (белок 2,5%); k_s — экспериментально найденная величина, характеризующая соотношение удельной активности выделяемой и загрязняющей структур в исходном гомогенате и полученном препарате; b — содержание белка выделяемой и загрязняющей структур в изолированном препарате (%). Согласно проведенным расчетам, препараты микросом, полученные описанным выше способом, содержали: 88—90% белка цитоплазматической сети, менее 1% белка лизосом и пероксисом; около 1,5% белка митохондрий и 10% неидентифицированного белка. Выход фракции составил 25% от общего количества цитоплазматической сети в гомогенате.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ МИКРОСОМНОЙ ФРАКЦИИ

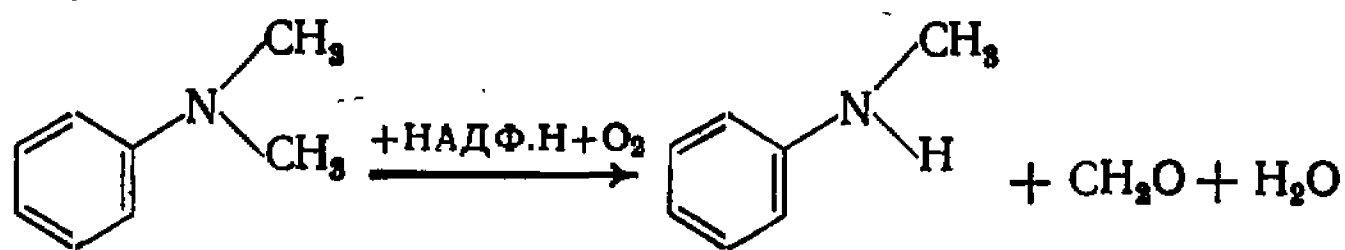
Среди окислительных процессов, протекающих в мембранах цитоплазматической сети, необходимо выделить два класса реакций: реакции гидроксилирования раз-

личных по химической природе соединений и реакции перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот. Методы измерения скорости перекисного окисления липидов в мембранах цитоплазматической сети подробно изложены в монографии Ю. А. Владимирова и А. И. Арчакова (1972). Поэтому ниже будут приведены только методы определения гидроксилазных активностей и сопряженных с ними реакций окисления НАД·Н и НАДФ·Н микросомными редокс-системами. Активность отдельных ферментов редокс-цепей может быть измерена с помощью добавляемых акцепторов электронов, редокс-потенциал которых позволяет им взаимодействовать со строго определенными переносчиками. Валовая скорость переноса электронов в редокс-цепях может быть измерена по скорости окисления НАД·Н и НАДФ·Н или по скорости поглощения кислорода. И, наконец, современная оптическая техника позволяет прямо измерять скорость переноса электронов на участках от флавопротеидов до цитохромов b_5 или Р 450 и содержание этих гемопротеидов во фракции.

Методы измерения гидроксилазной активности

Н - деметилазная активность

Одним из показателей гидроксилазной активности микросом может служить скорость деметилирования диметиланилина (ДМА), определяемая по количеству образовавшегося формальдегида. Реакция протекает на молекуле цитохрома Р 450 в присутствии НАДФ·Н и кислорода.



ДМА монометиланилин формальдегид

Ход определения. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала: 40 мМ трис-НСl буфер (рН 7,6), 16 мМ MgCl_2 , 3 мМ НАДФ·Н и $\sim 1,5$ мг белка микросом.

Реакцию начинали добавлением ДМА до 6 мМ концентрации (исходный 60 мМ раствор ДМА готовили на 0,05 н. растворе НСl). Опытные и контрольные (не содержащие НАДФ·Н) пробы инкубировали при 37°C

в течение 20 мин при интенсивном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением 0,25 мл смеси равных объемов 25% раствора $ZnSO_4$ и насыщенного раствора $Ba(OH)_2$. Для осаждения белков пробы центрифугировали при 3500 g в течение 10 мин. Содержание формальдегида в надосадочной жидкости определяли с помощью цветной реакции, предложенной Наш (Nash, 1953). К 0,5 мл надосадочной жидкости добавляли 2 мл реактива Наша, в состав которого входят: 2 М раствор ацетата аммония, 0,05 М раствор ледяной уксусной кислоты и 0,02 М раствор ацетилацетона. Для развития окраски пробы выдерживали в водяной бане при 37 °C в течение 45 мин. Интенсивность образовавшейся окраски измеряли на спектрофотометре СФ-4А при 412 нм.

В нашей лаборатории разработан микрометод определения содержания формальдегида: 250 мкл надосадочной жидкости вносят в микропробирки, затем добавляют 120 мкл реактива Наша, в 4 раза более концентрированного, чем приводится в прописи. Пробы инкубируют при 37 °C в течение 45 мин и определяют оптическую плотность в микрокювете к спектрофотометру СФ-4А при 412 нм.

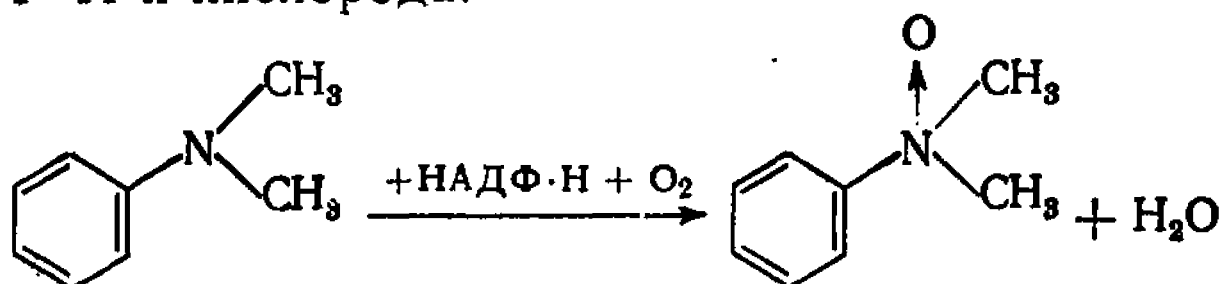
Ферментативную активность рассчитывают по калибровочной кривой, построенной с помощью стандартного раствора формальдегида. Максимальная скорость реакции деметилирования ДМА составляет 7—9 нмоль в 1 мин на 1 мг.

Вместо НАДФ·Н при определении N-деметилазной активности можно использовать изоцитрат- и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназные НАДФ·Н-генерирующие системы. Состав изоцитратдегидрогеназной НАДФ·Н-генерирующей системы: 10 мМ изоцитрат Na, 8 мМ $MgCl_2$, 40 мМ трис-HCl буфер (pH 7,6), изоцитратдегидрогеназа с содержанием 1 ферментной единицы в миллиметре — 1 ФЕ/мл («Reanal» Венгрия) и 0,6 мМ НАДФ⁺. Состав глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной НАДФ·Н-генерирующей системы: 10 мМ глюкозо-6-фосфат Na, 16 мМ $MgCl_2$, 10 мМ никотинамид, 40 мМ трис-HCl буфер (pH 7,6), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 0,5 ед/мл («Koch-Light», Англия) или 1 ед/мл («Fluka», Швеция), 0,6 мМ НАДФ⁺. В контрольные пробы НАДФ⁺ добавляют после прекращения реакции. Конечное содержание белка в пробе при работе с обеими системами составляет 1,5—2,0 мг. В качестве субстратов реакции N-деме-

тирования, кроме ДМА, можно использовать аминопирин или этилморфин в конечной концентрации 8 и 1 мМ соответственно. Максимальная скорость реакции деметилирования аминопирина составляет 4—6 нмолей в 1 мин на 1 мг, а этилморфина — 10—12 нмолей в 1 мин на 1 мг.

N-оксигеназная активность

В качестве субстрата в этой реакции используют ДМА. Реакция катализируется ФАД-содержащим флавопротеидом (аминоксидазой), протекает в присутствии НАДФ·Н и кислорода.



N-оксигеназную активность измеряют по количеству образовавшейся N-окиси ДМА, которая при рН 2,5 легко восстанавливается до диметиланилина и при добавлении NaNO_2 превращается в п-нитрозодиметиланилин — окрашенное соединение с максимумом поглощения при 420 нм.

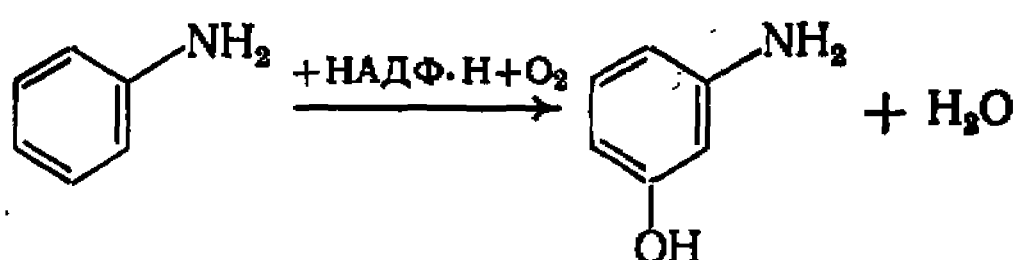
Ход определения. Содержание компонентов в инкубационной среде и ход определения до момента прекращения реакции такие же, как и в случае определения деметилазной активности. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,9 н. HClO_4 . Белки осаждали путем центрифугирования при 3500 g в течение 10 мин. В градуированные пробирки с притертыми пробками вносили по 1 мл надосадочной жидкости и в отдельной пробе рН доводили до 9,4 путем прибавления 0,33 мл 1 н. раствора NaOH и затем по каплям 0,05 н. раствора NaOH до бледно-розовой окраски при использовании в качестве индикатора фенолфталеина. рН пробы измеряли потенциометром ЛПУ-01 с микронасадкой и по данному образцу при визуальном сравнении доводили рН всех исследуемых проб. Для удаления неокисленного диметиланилина пробы трижды экстрагировали 5 мл диэтилового эфира при встряхивании в течение 2 мин. Эфир удаляли под водоструйным насосом. После третьей экстракции пробы в течение 20 мин оставляли открытыми для испарения оставшегося эфира, после чего рН среды

доводили до 2,4 добавлением 12 капель 5% раствора ТХУ. Затем вносили 0,2 мл 0,1 М раствора NaNO_2 и объем пробы доводили до 3 мл цитратным буфером (рН 2,4). Для развития окраски пробирки на 5 мин помещали в водяную баню при 60°C . Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре СФ-4А при 420 нм.

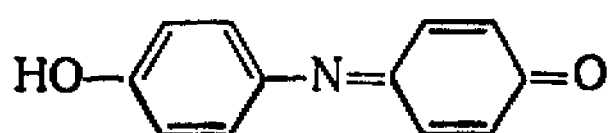
Для расчета ферментативной активности используют коэффициент молярной экстинкции паранитрозодиметиланилина — $8,2 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ (Ziegler, Pettit, 1964). Максимальная скорость N-оксигеназной реакции в микросомах печени крыс составляет 3—4 нмоль в 1 мин на 1 мг.

п - Гидроксилазная активность

Скорость п-гидроксилирования анилина определяли по количеству образовавшегося п-аминофенола. Реакция протекает на молекуле цитохрома Р 450 в присутствии НАДФ·Н и кислорода.



п-Аминофенол связывается с фенолом и в присутствии Na_2CO_3 образует окрашенный в синий цвет индофенольный комплекс:



Ход определения. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала: 40 мМ трис-НСl буфер (рН 7,3), 16 мМ MgCl_2 , 3 мМ НАДФ·Н и ~2 мг белка микросом. Реакцию начинали добавлением анилина до 3 мМ конечной концентрации. В контрольные пробы НАДФ·Н вносили после остановки реакции. Инкубацию проводили при 37°C в течение 20 мин при постоянном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 15% раствора ТХУ. После центрифугирования при 3500 g в течение 10 мин отбирали 1 мл надосадочной жидкости и содержание п-аминофенола определяли посредством добавления 0,5 мл 10% раствора Na_2CO_3 и 1,5 мл 2% раствора фенола в 0,2 н. растворе NaOH. Для развития окраски

пробы выдерживали в водяной бане при 37°C в течение 30 мин. Оптическую плотность измеряли при 630 нм на спектрофотометре Хитачи-124.

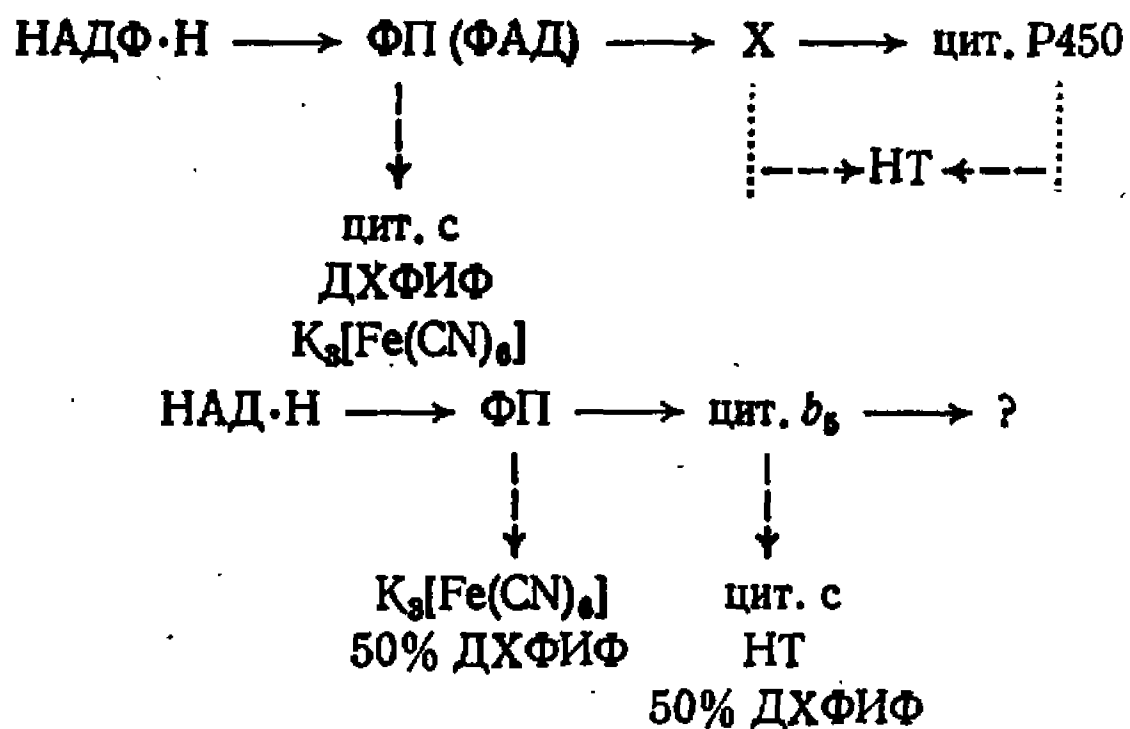
Величину ферментативной активности рассчитывали по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору п-аминофенола. Максимальная скорость реакции п-гидроксилирования анилина составляет 0,6—0,8 нмоль в 1 мин на 1 мг.

При отработке каждого метода состав инкубационной смеси и время инкубации подбирали такими, чтобы осуществлялась линейная зависимость между количеством белка, внесенного в пробу, и количеством образовавшегося продукта.

Методы измерения активности оксидоредуктаз с добавленными акцепторами электронов

При определении ферментативной активности оксидоредуктаз применяли искусственные акцепторы электронов: 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ), цитохром с, феррицианид калия $K_3[Fe(CN)_6]$ и неотетразолий синий (НТ). Активность НАДФ·Н (НАД·Н) : 2,6-ДХФИФ-, цитохром с- и феррицианид-редуктаз определяли по методу Далнера (Dallner, 1963), а НАДФ·Н (НАД·Н) : НТ-редуктаз — по методу Рерига и соавт. (Roering e. a., 1972).

Принцип метода основан на определении изменения поглощения акцепторов электронов при переходе их из окисленной формы в восстановленную. Участки редокс-цепей, с которых снимаются электроны, указаны на схеме штриховыми стрелками.



НАДФ·Н (НАД·Н) : 2,6-ДХФИФ-редуктазные активности. Инкубационная смесь объемом 3 мл содержала: 100 мкМ НАДФ·Н (НАД·Н), 40 мкМ 2,6-ДХФИФ, 100 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4) и ~50 мкг белка микросом при использовании в качестве субстрата НАДФ·Н и ~20 мкг белка при использовании НАД·Н. Измерение проводили в термостатированной 1 см кювете к спектрофотометру Хитачи-124 или СФ-4А при 30 °С в течение 1—3 мин. Скорость восстановления 2,6-ДХФИФ регистрировали при 600 нм. Коэффициент молярной экстинкции окисленного 2,6-ДХФИФ равен $21 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$. Максимальная скорость реакции в случае использования НАДФ·Н составляет 90—100 нмоль в 1 мин на 1 мг, а в случае НАД·Н — 150—170 нмоль в 1 мин на 1 мг.

НАДФ·Н (НАД·Н) : цитохром с-редуктазные активности. Состав инкубационной смеси: 100 мкМ НАДФ·Н (НАД·Н), 50 мкМ цитохром с, 330 мкМ NaCN, 100 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), ~40 мкг белка микросом при использовании в качестве субстрата НАДФ·Н и ~15 мкг в случае НАД·Н. Общий объем инкубационной смеси 3 мл. Измерение скорости восстановления цитохрома с проводили в термостатированной кювете к спектрофотометру Хитачи-124 или СФ-4А при 30 °С при 550 нм. Коэффициент молярной экстинкции цитохрома с (восстановленный минус окисленный) — $18,5 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$. Максимальная скорость реакции при использовании НАДФ·Н составляет 180—200 нмоль в 1 мин на 1 мг, а в случае НАД·Н — 1500—1900 нмоль в 1 мин на 1 мг.

НАДФ·Н (НАД·Н) : $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -редуктазные активности. Инкубационная смесь объемом 3 мл содержала: 100 мкМ НАДФ·Н (НАД·Н), 330 мкМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 100 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), ~500 мкг белка микросом для НАДФ·Н : $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -редуктазы и ~20 мкг белка при определении активности НАД·Н : феррицианид-редуктазы. Измерение скорости восстановления феррицианида проводили так же, как и при определении активности предыдущих ферментов при 420 нм. Коэффициент молярной экстинкции окисленного феррицианида равен $1,02 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$. Максимальная скорость реакции в случае использования НАДФ·Н составляет 150—200 нмоль в 1 мин на 1 мг, а в случае НАД·Н — 5000—6000 нмоль в 1 мин на 1 мг.

НАДФ·Н (НАД·Н) : НТ-редуктазные активности. Инкубационная смесь объемом 3 мл содержала: 50 мкМ

НАДФ·Н (НАД·Н), 20 мкМ неотетразолий, 100 мМ трис-HCl буфер (pH 7,4), ~100 мкг белка микросом для НАДФ·Н:НТ-редуктазной реакции и ~20 мкг белка при определении активности НАД·Н:НТ-редуктазы. Измерение скорости восстановления неотетразолия проводили в термостатированной кювете к спектрофотометру Хитачи-124 при 30 °С, в течение 2—3 мин при 550 нм. Коэффициент молярной экстинкции окисленного неотетразолия равен $28,8 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$. Максимальная скорость реакции в случае использования НАДФ·Н составляет 20—25 нмоль в 1 мин на 1 мг, а при использовании НАД·Н — 90—100 нмоль в 1 мин на 1 мг.

Методы измерения дыхательной активности микросом

Флуориметрический метод. Принцип метода основан на измерении скорости падения флуоресценции НАДФ·Н и НАД·Н в процессе их окисления.

Ход определения. Инкубационная смесь объемом 3 мл содержала 100 мМ трис-HCl буфер (pH 7,4) и ~3 мг белка микросом. Реакцию начинали добавлением НАДФ·Н или НАД·Н до 33 мкМ концентрации и регистрацию флуоресценции проводили на флуориметре ЭФ-3М (фильтр возбуждения 366 нм, фильтр регистрации 420 нм) при 30 °С в термостатированной кювете с подключенным к нему самописцем КСП-4.

Скорость окисления НАДФ·Н в микросомах печени крыс составляет 4—6 нмоль в 1 мин на 1 мг, а НАД·Н — 2—3 нмоль в 1 мин на 1 мг.

Полярографический метод. Измерение скорости потребления кислорода препаратами микросом проводили с помощью стационарного платинового электрода открытого типа на полярографе LP-60.

Ход определения. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала 100 мМ трис-HCl буфер (pH 7,4) и ~4 мг белка микросом. Реакцию начинали добавлением растворов НАДФ·Н или НАД·Н до 1 мМ концентрации. Запись проводили при 30 °С в течение 2—3 мин. Для ингибирования реакции перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот, сопровождающихся интенсивным потреблением кислорода, в ячейку полярографа добавляли ЭДТА до 0,6 мМ концентрации.

Скорость потребления кислорода в микросомах без ЭДТА составляет 7—9 нмоль в 1 мин на 1 мг, в присутствии 0,6 мМ раствора ЭДТА — 3—5 нмоль в 1 мин на 1 мг.

**Метод измерения содержания и скорости окисления —
восстановления цитохромов b_5 и Р 450
в микросомной фракции**

**Определение содержания
цитохромов b_5 и Р 450**

Определение содержания цитохрома b_5 основано на измерении разницы в поглощении окисленной и восстановленной форм гемопротейда, а цитохрома Р 450 — на измерении величины поглощения комплекса восстановленного цитохрома Р 450 с окисью углерода при 450 нм.

Ход определения. Измерение содержания цитохромов b_5 и Р 450 проводили в суспензии микросом [100 или 200 мМ трис-НСI буфер (рН 7,4) и 1—2 мг белка в 1 мл] на спектрофотометрах СФ-10 и СФ-14 (по двухлучевой схеме) или Хитачи-356 (по двухволновой схеме). При работе на СФ-10 использовали цилиндрические кюветы высотой 12 мм и диаметром 26 мм. В каждую из кювет вносили по 4 мл инкубационной смеси и на кулачке светопропускания нулевую линию выводили примерно на уровень 70%. Запись проводили в диапазоне волн 400—500 нм. В правую кювету добавляли несколько кристаллов дитионита или какого-либо другого восстановителя в зависимости от целей опыта и записывали дифференциальный спектр цитохрома b_5 . При этом минимум поглощения имел место при 408 нм, а максимум — при 428 нм. Разница поглощения между 408 и 428 нм ($\Delta OP_{408-428}$) служила показателем, характеризующим содержание цитохрома. При измерениях на спектрофотометре Хитачи-356 использовали следующие пары волн: 408—424 и 424—475 нм. Содержание цитохрома b_5 в микросомной фракции, рассчитанное с помощью коэффициента молярной экстинкции $164 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ (Omiga, Sato, 1964), составляет 0,4—0,6 нмоль в 1 мин на 1 мг.

Измерение содержания цитохрома Р 450 проводили по двухлучевой схеме на спектрофотометре СФ-10. После записи нулевой линии через левую кювету в течение

1 мин пропускали окись углерода, которую получали смешиванием концентрированных растворов муравьиной и серной кислот и очищали пропусканием через раствор пирогаллола А. Затем в обе кюветы добавляли несколько кристалликов дитионита и записывали дифференциальный спектр. Разница между максимумом поглощения при 450 нм и минимумом при 475 или 490 нм является показателем содержания гемопротейда в микросомах. При записи на кулачке светопропускания цена деления калиброванной бумаги в 5 раз меньше, чем при работе на кулачке оптической плотности. В некоторых случаях содержание цитохрома измерялось на спектрофотометре СФ-10, модифицированном в нашей лаборатории таким образом, что цена деления шкалы ленты уменьшалась еще в 5, 10 и 20 раз по сравнению со шкалой светопропускания.

В случае определения содержания цитохрома Р 450 на спектрофотометре Хитачи-356 измеряли $\Delta OP_{450-475}$. Содержание цитохрома Р 450 в микросомной фракции рассчитывали по молярному коэффициенту экстинкции, $91 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ (Omura, Sato, 1964). Оно составляет 0,8—0,9 нмоль в 1 мин на 1 мг.

Измерение скорости восстановления — окисления цитохромов b_5 и Р 450

Скорость восстановления — окисления цитохромов b_5 и Р 450 в аэробных условиях изучали в специально изготовленных термостатируемых кюветах к спектрофотометру СФ-10 по двухлучевой схеме или в термостатируемой кювете к спектрофотометру Хитачи-356 по двухволновой схеме при температуре 25° или 30°С. Инкубационную смесь, содержащую 1 мг белка микросом в мл, 100 мМ трис-НСI буфер (рН 7,4), вносили в кюветы и записывали нулевую линию. Затем в опытную кювету добавляли раствор НАДФ·Н или раствор НАД·Н до 33 мкМ и 7 тМ концентрации соответственно. При регистрации спектра цитохрома Р 450 предварительно через опытную кювету пропускали окись углерода в течение 1 мин. Запись дифференциального спектра цитохромов повторяли через каждые 30 с на СФ-10. При работе на спектрофотометре Хитачи-356 после добавления восстановителя запись проводили непрерывно. Показателями скорости

восстановления — окисления цитохромов служат уровень их максимальной восстановленности (p_m) и время полуокисления ($t_{1/2}$). Снижение или увеличение p_m на фоне нормального $t_{1/2}$ свидетельствует о соответствующем изменении скорости реакции восстановления цитохромов. Одновременное изменение данных показателей свидетельствует об ускорении или замедлении скорости окисления восстановленных гемопротеидов.

Измерение скорости восстановления цитохромов b_5 и Р 450 в анаэробных условиях проводили по двухволновой схеме на спектрофотометре Хитачи-356 в 1 см кювете при 25 °С. Реакционная смесь объемом 3 мл содержала 40 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), 2—3 мг белка микросом, $2 \cdot 10^{-5}$ М ротенон, 15 мМ сукцинат, 2—3 мг белка субмитохондриальных частиц. Наступление анаэробии контролировали по восстановлению цитохромов $a + a_3$ при $\Delta OP_{603-630}$. НАДФ·Н или НАД·Н добавляли до конечной концентрации 33 мкМ с помощью специального приспособления для быстрого смешивания. Перфорированная пластинка с нанесенным на нее раствором пиридиндинуклеотида продавливалась через содержимое кюветы за 0,5 с. При записи скорости восстановления цитохрома Р 450 через кювету предварительно пропускали окись углерода. Восстановление цитохрома b_5 измеряли по $\Delta OP_{424-475}$, а цитохрома Р 450 — по $\Delta OP_{450-475}$.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ

При многих патологических состояниях отмечается накопление в тканях продуктов перекисного окисления липидов, что сопровождается нарушением функций целого ряда ферментных систем (Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков, 1972).

Для того чтобы получить представление о перекисном окислении липидов в тканях животных, целесообразно определять диеновую конъюгацию (появляется на начальных этапах перекисного окисления), гидроперекиси липидов (обнаруживаются на более поздних этапах пе-

рекисного окисления) и, наконец, малоновый диальдегид — один из наиболее важных конечных продуктов перекисного окисления липидов.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИЕНОВОЙ КОНЬЮГАЦИИ НЕНАСЫЩЕННЫХ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

И. Д. СТАЛЬНАЯ

Принцип метода

В ходе перекисного окисления на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных высших жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения — $\lambda_{\text{макс}} = 233 \text{ нм}$; $\epsilon = 2,2 \cdot 10^{-5} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (Recknagel, Ghoshal, 1966).

РЕАКТИВЫ

Н. Гептан.

Н. Изопропиловый спирт.

0,9% раствор хлорида калия.

0,1 М фосфатный буферный раствор (рН 7,6).

Ниже описано определение диеновой конъюгации в гомогенате и митохондриальной фракции грануляционно-фиброзной ткани крыс.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску ткани, отмытую от крови в 0,9% растворе хлорида калия, замораживают в жидком азоте и тщательно размельчают в охлажденной фарфоровой ступке. Митохондриальную фракцию выделяют из грануляционно-фиброзной ткани по методу Шнайдера (Schneider, 1948). Отмытый в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,6) осадок митохондрий ресуспендируют в 5 мл того же буфера.

Затем 1,0—1,5 г тканевого порошка или 1 мл приготовленной суспензии митохондрий (10—15 мг белка) растирают в течение 15 мин в плотно пригнанном стеклянном гомогенизаторе Поттера — Эльвегейма с 9 мл экстрагирующей смеси гептана с изопропиловым спиртом в объемном отношении 1:1. Полученную суспензию

помещают в полиэтиленовые пробирки, плотно закрывают их пробками, чтобы избежать испарения экстрагирующей фазы во время центрифугирования. Пробы центрифугируют 10 мин при 4000 g на центрифуге ЦУМ-1. Надосадочную фракцию переносят в градуированные пробирки и добавляют $\frac{1}{10}$ объема дистиллированной воды. После двукратного встряхивания и расслаивания фаз отсасывают гептановую фазу. К равным объемам по 0,5 мл добавляют этиловый спирт в объемном отношении 1 : 5—1 : 10. Оптическую плотность проб измеряют на спектрофотометре СФ-16 при 233 нм в кварцевых кюветах (ход луча 10 мм). В качестве контроля используют пробы, содержащие только экстрагирующую фазу, или вместо 1 мл суспензии митохондрий 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,6).

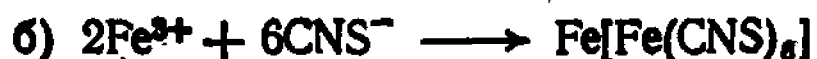
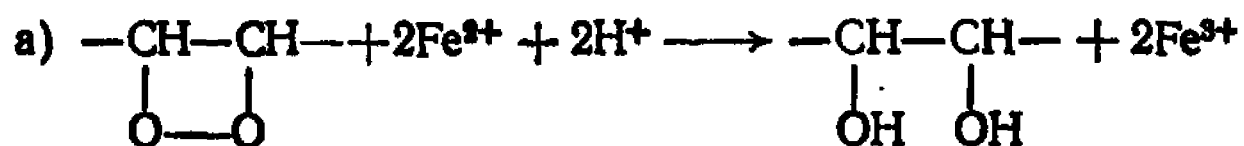
Содержание диеновых конъюгатов в пробе рассчитывают, исходя из величины молярного коэффициента экстинкции при 233 нм для сопряженных диенов полиненасыщенных высших жирных кислот, равного $2,2 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОПЕРЕКИСЕЯ ЛИПИДОВ С ПОМОЩЬЮ ТИОЦИАНАТА АММОНИЯ

Л. А. РОМАНОВА, И. Д. СТАЛЬНАЯ

Принцип метода

В разбавленных водных растворах гидроперекиси липидов окисляют Fe^{2+} до Fe^{3+} . Последний может быть обнаружен с помощью цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм (Summer, 1943).



Реактивы

5% раствор соли Мора, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, перекристаллизованной из 3% раствора соляной кислоты.

Концентрированная соляная кислота.

20% раствор тиоцианата аммония (перекристаллизованного).

0,025 М трис-HCl буфер (pH 7,4), содержащий 0,175 М KCl.

50% раствор трихлоруксусной кислоты.

ПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

В качестве примера описана подготовка митохондриальной фракции печени крысы и определение в этой фракции содержания гидроперекисей.

Митохондриальную фракцию выделяют из печени крысы по методу Шнайдера (Schneider, 1948) с некоторыми модификациями. 10% гомогенат ткани печени центрифугируют при 600 g в течение 10 мин (центрифуга ЦЛР-1 с охлаждением). Осадок, содержащий ядра и неразрушенные клеточные элементы, отбрасывают. Надосадочную жидкость центрифугируют в течение 20 мин при 12 500 g (это и последующие центрифугирования проводили на центрифуге ЦВР-1). Полученный осадок митохондрий суспендируют в 0,025 М трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 0,175 М KCl, объем которого составляет $\frac{1}{10}$ объема гомогената, и центрифугируют при 12 500 g в течение 15 мин. Осадок митохондриальный снова суспендируют в 10 мл указанного буферного раствора.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Приготовленную описанным выше методом митохондриальную фракцию по 2 мл (концентрация белка 7—8 мг/мл) помещают в центрифужные пробирки и осаждают белок добавлением 0,2 мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5%). Образующийся осадок отделяют центрифугированием (центрифуга ЦУМ-1, 4000 g): 2 мл надосадочной жидкости доводят 96% этанолом до 27 мл. К равным объемам по 27 мл добавляют 0,2 мл концентрированной соляной кислоты и 0,025 мл 5% раствора соли Мора в 3% соляной кислоте, пробы интенсивно встряхивают. Точно через 30 с приливают 1 мл 20% раствора тиоцианата аммония, после чего развивается малиновая окраска. В качестве контроля используют пробы, содержащие 96% этанол вместо надосадочной жидкости. Измерение оптической плот-

Таблица 8

Влияние катионов двухвалентного железа на перекисное окисление липидов в печени крысы

Время инкубации в присутствии 0,1 мМ FeSO ₄ , мин	E ₄₈₀ *
0	0,025
5	0,068
10	0,100
15	0,070
30	0,044

* Величины представляют собой среднее арифметическое из четырех параллельных опытов.

ло условия стимулирования перекисного окисления липидов Fe²⁺. В качестве контроля использовали пробы, не обработанные FeSO₄.

ности производят в течение 10 мин после добавления тиоцианата аммония на СФ-16 при 480 нм (ход луча в кювете 10 мм) против контрольной пробы.

Об относительном уровне гидроперекисей в биологическом материале судят по величине оптической плотности при 480 нм.

Так, например (табл. 8), проводили определение относительного содержания гидроперекисей в интактной митохондриальной фракции и фракции митохондрий, инкубированной при 37 °С в разное время в присутствии 0,1 мМ FeSO₄, что создава-

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА С ПОМОЩЬЮ ТИОБАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ

И. Д. СТАЛЬНАЯ, Т. Г. ГАРИШВИЛИ,

Принцип метода

При высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой, образуя окрашенный триметиновый комплекс, с максимумом поглощения при 532 нм. Молярный коэффициент экстинкции этого комплекса — $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ (Hunter e. a., 1963)*.

РЕАКТИВЫ

0,025 М трис-HCl буфер (рН 7,4), содержащий 0,175 М хлорида калия.

17% раствор трихлоруксусной кислоты.

0,8% водный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК).

ПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

В качестве примера описана подготовка гомогената грануляционно-фиброзной ткани и митохондриальной фракции печени крысы.

Навеску ткани замораживают в жидком азоте, тщательно растирают в охлажденной фарфоровой ступке. 1 г полученного тканевого порошка гомогенизируют в 3 мл вышеуказанного буферного раствора (рН 7,4). В пробы вносят по 6—18 мг белка (обычно в 0,5 мл буферного раствора).

Митохондриальную фракцию выделяют из печени крысы по методу Шнайдера (Schneider, 1948) с некоторыми модификациями (см. с. 65). Необходимо отмывание осадка митохондрий буферным раствором (рН 7,4) для удаления следов сахарозы, мешающих развитию окраски при реакции с ТБК.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Приготовленный описанным выше образом биологический материал (тканевый гомогенат или митохондриальная фракция) в буферном растворе (рН 7,4) по 2,5 мл помещают в центрифужные пробирки и осаждают белок добавлением 1 мл 17% раствора трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5%). Образующийся осадок отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 4000 g (центрифуга ЦУМ-1). Надосадочную жидкость по 2 мл переносят в пробирки, добавляют по 1 мл 0,8% водного раствора ТБК и помещают пробы на 10 мин в кипящую водяную баню. В качестве контроля используют пробы, содержащие вместо надосадочной жидкости буферный раствор (рН 7,4). После развития розовой окраски пробы охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность при 532 нм (СФ-16, кювета с длиной хода луча 1 см) против контрольной пробы.

Количество малонового диальдегида рассчитывают, используя указанную выше величину молярного коэффициента экстинкции, и полученный результат выражают в нмолях на пробу.

В качестве иллюстрации приводим описание опыта по изучению влияния различных концентраций Fe^{2+} на образование малонового диальдегида в митохондриальной фракции печени крыс.

Условия опыта. В опытные пробирки, содержащие по 40 мг митохондриального белка в буферном растворе (рН 7,4), вносили раствор, приготовленный из соли $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ с таким расчетом, чтобы в пробах конечные концентрации Fe^{2+} были равны указанным в табл. 9 величинам. Конечный объем проб составлял 10 мл. После добавления Fe^{2+} пробы инкубировали при 32 °С в течение 60 мин в аппарате Варбурга. После окончания инкубации из проб отбирали равные объемы по 2,5 мл для определения малонового диальдегида. В качестве контроля использовали пробы, не обработанные FeSO_4 .

Т а б л и ц а 9

Стимулирование образования малонового диальдегида катионами двухвалентного железа в печени крысы

Концентрация FeSO_4 (М)	Образование малонового диальдегида в нмолях на пробу (среднее арифметическое $\pm$ средняя ошибка по данным 8 параллельных определений)
0	$2,2 \pm 1,4$
10^{-6}	$7,9 \pm 2,2$
10^{-5}	$17,4 \pm 2,0$
10^{-4}	$30,3 \pm 4,0$

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТА ПРИ ПОМОЩИ АПОТРИПТОФАНАЗЫ E. COLI

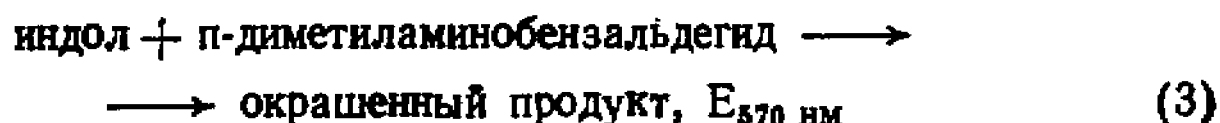
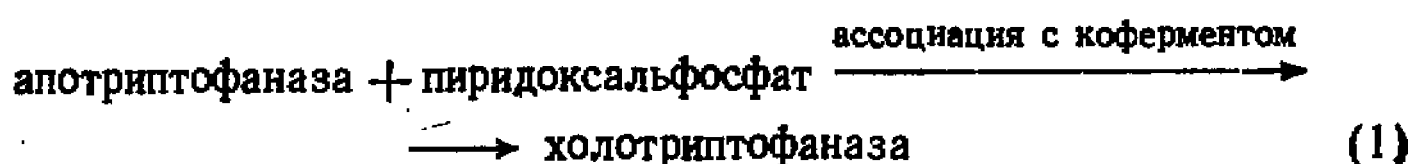
Ю. В. БУКИН, А. В. СЕРГЕЕВ

В последние годы были разработаны высокочувствительные ферментативные методы определения пиридоксаль-5'-фосфата (пиридоксальфосфат — основная коферментная форма витамина B_6) при помощи апофермента триптофаназы E. coli (Okada e. a., 1970; Haskell, Snell, 1972) и апофермента тирозиндекарбоксилазы S. faecalis (Sundaresan, Coursin, 1970). Указанные методы требуют применения меченных радиоактивным изотопом субстратов или получения высокоочищенных препаратов апофермента. Нами предложена сравнительно простая модификация метода определения пиридоксальфосфата в системе с апотриптофаназой, позволяющая определять

1—40 нг кофермента в 1,5 мл испытуемого раствора. Процедура определения не требует предварительного выделения пиридоксальфосфата из анализируемой смеси, применения радиоактивных соединений и получения апотриптофаназы в виде индивидуального белка.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение пиридоксальфосфата в системе с апотриптофаназой основано на следующей последовательности реакций (1—3):



В стандартных условиях количество холофермента триптофаназы, образующееся в реакции (1), и образование индола при ферментативной деградации L-триптофана в реакции (2) является функцией концентрации пиридоксальфосфата в системе. Индол в кислой среде образует с п-диметиламинобензальдегидом стойкий окрашенный в красный цвет продукт, концентрация которого может измерена спектрофотометрически.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Пиридоксальфосфат (моногидрат), относительная молекулярная масса 265,16. Исходный раствор, содержащий в 1 мл 0,1 мг пиридоксальфосфата в 0,001 н. растворе КОН, запаивают в ампулы и сохраняют в темноте при -20°C в течение 2—3 мес. Точную концентрацию пиридоксальфосфата в растворе устанавливают спектрофотометрически (при 388 нм в 0,1 н. КОН, $\epsilon=6500$; при pH 7,0 $\epsilon=4900$). Рабочий раствор, содержащий 10 или 50 нг пиридоксальфосфата в 1 мл, готовят непосредственно перед построением калибровочного графика путем разбавления исходного раствора пиридоксальфосфата дистиллированной водой. Раствор пиридоксальфосфата тщательно оберегают от действия света.

0,1 М калий-фосфатный буферный раствор. (рН 8,3).

0,1 М раствор восстановленного глутатиона в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 8,3).

0,05 М раствор L-триптофана. Навеску L-триптофана растворяют в дистиллированной воде, подкисленной HCl. К раствору добавляют несколько капель 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 8,3) и нейтрализуют 0,2 н. раствором КОН.

Толуол.

70% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

5% раствор п-диметиламинобензальдегида в 96% этаноле (сохраняют в темноте).

Смесь H_2SO_4 с этиловым спиртом (80 мл концентрированной H_2SO_4 в 1 л 96% этилового спирта).

Кислотно-спиртовой раствор п-диметиламинобензальдегида. Готовят непосредственно перед использованием путем смешивания 1 части 5% раствора п-диметиламинобензальдегида в 96% этиловом спирте с 9 частями смеси H_2SO_4 — этиловый спирт.

10% раствор HPO_3 , полученный из P_2O_5 (приготовление см. ниже).

Препарат апотриптофаназы *E. coli* (получение бактериальной массы и приготовление препарата апофермента см. ниже).

Приготовление HPO_3 из P_2O_5

В фарфоровую чашку с 50 г колотого льда, приготовленного из дистиллированной воды, вносят небольшими порциями около 8 г P_2O_5 (х. ч.). Выпадающие в осадок сгустки коллоидных полифосфорных кислот удаляют фильтрованием через пористый стеклянный фильтр или путем центрифугирования при 5000 g в течение 30 мин. Точную концентрацию раствора $(HPO_3)_n$ устанавливают по относительной плотности или титрованием в присутствии метилового оранжевого. Свежеприготовленную метафосфорную кислоту разбавляют дистиллированной водой до получения 1,36 н. раствора (10,1% раствор в расчете на $P_2O_5 \cdot d_4^{20} = 1,0764$). При хранении на холоде раствор годен для работы в течение 2 нед. Рабочий 5% раствор метафосфорной кислоты для экстракции пиридоксальфосфата из тканей готовят непосредственно перед использованием.

Получение биомассы *E. coli* (штамм Крука, ATCC 8739 или штамм В/It7-А)*.

Состав питательных сред, используемых для выращивания штаммов *E. coli*, служащих хорошими источниками триптофаназы, приведен в табл. 10. Среда для выращивания штамма В/It7-А сложнее, чем среда для выращивания штамма Крука, однако преимуществом штамма В/It7-А является относительно высокое содержание в биомассе конститутивного фермента триптофаназы.

Культуру *E. coli* (штамм Крука) поддерживают в косяках на мясо-пептонном агаре или на среде 1 (см. табл. 10). Культуру *E. coli* (мутантный штамм В/It7-А) поддерживают в косяках на среде 2 (см. табл. 10). Пе-

Таблица 10

Состав сред для выращивания *E. coli*

Компоненты	Среда 1	Среда	Среда 3
KH_2PO_4		3,0	7,5
$\text{KHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5,0	9,5	21,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		1,0	1,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0,01	0,003
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,001	0,003
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,1	0,003
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$			0,001
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			0,001
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$			0,001
NaCl			0,25
Глюкоза	1,0	2,0*	
Индол	0,01		0,25
L-Триптофан			0,33
Дрожжевой экстракт	10,0		1,0
Ферментативный гидролизат казеина	10,0		20,0
Агар-агар**	20,0	20,0	

* При выращивании посевного материала содержание глюкозы повышают до 10 г в 1 л среды.

** Агар-агар вносят в среду только при пересевах культуры на косяки.

* Необходимые штаммы *E. coli*, полученные нами от проф. Е. Е. Snell (Беркли, США), поддерживаются в Институте экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР и могут быть представлены для работы заинтересованным лицам и учреждениям.

ресев культур на свежую среду производят не реже 1 раза в месяц. Посевной материал выращивают 12—18 ч при 37 °С в эрленмейеровских колбах емкостью 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды 1 (штамм Крука) или 100 мл среды 2, содержащей 10 г глюкозы в 1 л (штамм В/It7-А). Для энергичной аэрации колбы инкубируют на круговой качалке при скорости 180—200 об/мин.

Для получения биомассы *E. coli* (штамм Крука) в питательную среду 1 вносят посевной материал в объеме 5%. Выращивание биомассы производят при 37 °С и энергичной аэрации в течение 18—24 ч в ферментерах, бутылках или в эрленмейеровских колбах на 750 мл, содержащих 100 мл среды.

Для получения биомассы *E. coli* (штамм В/It7-А) в питательную среду 3 вносят посевной материал (20% по объему) и выращивание биомассы проводят в условиях энергичной аэрации при 37 °С в течение 12 ч.

После окончания инкубации культуральную жидкость охлаждают до 0—4 °С. Клеточную массу отделяют путем центрифугирования при 10 000—15 000 g в течение 15—20 мин при 2—4 °С. Клетки промывают 20-кратным объемом 0,15 М раствора NaCl, а затем тройным объемом дистиллированной воды. Выход влажных клеток составляет 3—4 г в расчете на 1 л культуральной среды. Полученную влажную биомассу сохраняют при 0 °С и используют для приготовления препарата апотриптофаназы в течение ближайших 12—24 ч. Биомасса может быть подвергнута предварительно лиофильной сушке. Лиофилизированные клетки, хранящиеся в герметической упаковке при —20 °С, сохраняют исходную активность триптофаназы в течение 6 и более мес.

Получение препарата апофермента триптофаназы

Бактериальные клетки разрушают ультразвуком, триптофаназу осаждают из клеточного экстракта в изoeлектрической точке при рН 4,7. Активный осадок подвергают диализу и сырой препарат апотриптофаназы обрабатывают боргидридом натрия для инактивации примеси холофермента.

Реактивы и материалы: 0,1 М (рН 7,0) и 1 М (рН 7,3) калий-фосфатные буферные растворы.

ЭДТА (свободная кислота).

2-Меркаптоэтанол.

1 М и 0,1 М растворы уксусной кислоты.

NaBH₄ или KBH₄.

Сефадекс G-25 (колонка размером 2,5×40 см), уравновешенный 0,1 М калий-фосфатным буфером (рН 7,3).

Процедура получения. Все операции, связанные с получением апотриптофаназы *E. coli*, проводят при 0—4 °С. Влажную биомассу (10 г) или лиофилизированные клетки *E. coli* (2 г) суспендируют в 50 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 2 мМ ЭДТА и 5 мМ 2-меркаптоэтанола. Клетки разрушают с помощью ультразвукового дезинтегратора (20 кГц, 50 Вт, 5—10 мин), фрагменты клеток удаляют центрифугированием (30 000 g, 20 мин), надосадочную жидкость при постоянном перемешивании подкисляют 1 М раствором уксусной кислоты до рН 4,7 и выпавший осадок, полученный в результате центрифугирования (30 000 g, 30 мин), суспендируют в 50 мл дистиллированной воды и подвергают диализу против 8—10 л воды при перемешивании в течение 12 ч. После диализа к полученному раствору сырого препарата апотриптофаназы (объем около 50 мл) добавляют 5 мл 1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,3) и при постоянном перемешивании 10 мг NaBH₄ или KBH₄ (конечная концентрация борогидрида натрия около 0,005 М). Раствор апофермента перемешивают 10 мин, поддерживая рН в пределах 7,2—7,4 добавлением нескольких капель 0,1 М раствора уксусной кислоты, и затем подвергают диализу против 10 л воды в течение 12—15 ч или гельфильтрации через колонку с сефадексом G-25. Полученный раствор апотриптофаназы разбавляют дистиллированной водой так, чтобы концентрация белка в препарате из клеток *E. coli* (штамм Крука) соответствовала 1 мг в 1 мл, а в препарате из клеток *E. coli* (штамм В/It7-А) — 0,1 мг в 1 мл. Содержание белка определяют по Лоури (Lowry e. a., 1951)*.

Остаточная активность препаратов апотриптофаназы в стандартных условиях определения пиридоксальфосфата колеблется обычно в пределах 0,03—0,06 Е_{570 нм}. Если остаточная активность (фон) превышает 0,1 Е, процедуру осаждения активного белка в изoeлектрической точке и обработку раствора апотриптофаназы NaBH₄ с последующим диализом повторяют. Полученный жидкий препарат апотриптофаназы запаивают в ампулы и сохра-

няют при -20°C . Препарат апотриптофаназы пригоден для работы в течение 2—6 мес. Активность препарата постепенно снижается, поэтому стандартные калибровочные графики для определения пиридоксальфосфата необходимо строить каждые 2—3 нед.

ЭКСТРАКЦИЯ ПИРИДОКСАЛЬФОСФАТА ИЗ ТКАНЕЙ

Всю работу, связанную с экстракцией пиридоксальфосфата из биологического материала, и последующее определение пиридоксальфосфата проводят при сумеречном освещении или при красном свете. В зависимости от объекта исследования навеску ткани массой 5—10 или 50—100 мг гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе с равным объемом 10% раствора HPO_3 , к смеси добавляют 18-кратный по отношению к кислоте объем дистиллированной воды и ткань снова гомогенизируют. Полученный гомогенат ткани прогревают 15 мин на водяной бане при 80°C , смесь охлаждают, центрифугируют и надосадочную жидкость используют для определения пиридоксальфосфата. Объем пробы для определения пиридоксальфосфата не должен превышать 0,25 мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРИДОКСАЛЬФОСФАТА В СИСТЕМЕ С АПОТРИПТОФАНАЗОЙ

В колбы емкостью 25—50 мл, снабженные пришлифованной пробкой, вносят: 1) 0,05—0,2 мл анализируемого экстракта ткани или 2 мл воды (для определения остаточной активности апотриптофаназы) или стандартный раствор пиридоксальфосфата (1—50 нг в 0,1—2,0 мл для построения калибровочного графика); 2) рассчитанное количество 0,2 н. раствора KOH для нейтрализации HPO_3 экстракта ткани до pH 8,0—8,3 и воду до общего объема 2 мл; 3) 3 мл толуола; 4) 0,45 мл свежеприготовленного рабочего раствора апотриптофаназы, содержащего 0,1 мл раствора апофермента, 0,1 мл 0,1 М раствора восстановленного глутатиона и 0,25 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 8,3). Пробы преинкубируют 10—15 мин при 37°C при качании. Затем к пробам добавляют 0,2 мл 0,05 М раствора L-триптофана и пробы при постоянном качании инкубируют 60 мин при 37°C .

Реакцию останавливают путем добавления к пробам 0,2 мл 70% раствора трихлоруксусной кислоты. Для полноты экстракции индола в толуол пробы энергично встряхивают, смесь переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при небольшой скорости (65 g, 3—5 мин) для четкого разделения фаз. Из верхней фазы (толуол) отбирают для анализа 1,5 мл. Анализируемый толуол вносят в пробирки, содержащие 5 мл свежеприготовленного раствора п-диметилбензальдегида в смеси H_2SO_4 — этиловый спирт. В контрольные пробы вносят чистый толуол. Пробы тщательно перемешивают и через 15 мин растворы фотометрируют при 570 нм в 1 см кюветах на спектрофотометре СФ-4А против контрольных проб. Окраска стабильна при комнатной температуре по крайней мере в течение 4—5 ч.

Содержание пиридоксальфосфата в пробах определяют по стандартному калибровочному графику, построенному для известных количеств пиридоксальфосфата, и на этой основе рассчитывают содержание пиридоксальфосфата в исследуемой ткани. Ошибка метода определения пиридоксальфосфата в стандартных растворах находится в пределах $\pm 3\%$. Ошибка метода при определении пиридоксальфосфата в биологических объектах достигает $\pm 6\%$.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА

Метод используют для определения содержания пиридоксальфосфата в тканях животных и человека, а также при исследовании растительных объектов. В печени, мозге и селезенке мышей содержится в норме соответственно $2,16 \pm 0,07$, $7,8 \pm 0,67$ и $0,90 \pm 0,05$ мкг пиридоксальфосфата в расчете на 1 г массы влажной ткани (Ю. В. Букин, А. В. Сергеев, 1970). Для проведения анализа достаточно располагать 1—5 мг ткани; в связи с этим метод может быть использован в клинике при анализе небольших образцов материала, полученных при биопсии. Препарат апотриптофаназы не содержит пиридоксалькиназу, поэтому метод позволяет определять пиридоксальфосфат, образовавшийся в пиридоксалькиназной реакции, непосредственно в инкубационной смеси, содержащей АТФ и пиридоксаль (см. Ю. В. Букин, с. 76).

МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПИРИДОКСАЛЬКИНАЗЫ В ТКАНЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЕЛОВЕКА

Ю. В. БУКИН

Пиридоксалькиназа (АТФ: пиридоксаль-5-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.35) относится к числу ключевых ферментов, обеспечивающих в организме животных и человека биосинтез пиридоксальфосфата и пиридоксаминфосфата (коферментные формы витамина В₆). В присутствии АТФ и некоторых двухвалентных ионов металлов фермент фосфорилирует все три формы витамина В₆ с образованием соответствующих 5'-фосфорных эфиров: пиридоксол, пиридоксаль, пиридоксамин + АТФ → пиридоксолфосфат, пиридоксальфосфат, пиридоксаминофосфат + АДФ.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Пиридоксальфосфат, образующийся в пиридоксалькиназной реакции в присутствии пиридоксаля, АТФ и Zn^{2+} , определяют в системе с апотриптофаназой *E. coli* (см. Ю. В. Букин, А. В. Сергеев, с. 68). Метод не требует выделения пиридоксальфосфата из инкубационной среды. Указанный принцип определения был использован ранее McConnick и соавторами (1961, 1970). Разработанная нами модификация метода (Ю. В. Букин, 1973) отличается высокой чувствительностью и позволяет количественно определять активность пиридоксалькиназы в гомогенатах и экстрактах тканей.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

0,077 М калий-фосфатный буферный раствор (рН 5,8), далее буфер.

0,25 М раствор сахарозы (рН 7,0).

2,5 мМ свежеприготовленный раствор пиридоксаля (хлоргидрата) в буфере.

2,5 мМ свежеприготовленный раствор АТФ- Na_2 в буфере.

0,1 мМ раствор $ZnSO_4$ или $Zn(CH_3COOH)_2$ в дистиллированной воде.

Субстратная смесь — смешивают растворы пиридоксаля, АТФ и Zn^{2+} в пропорции 2:2:1 непосредственно перед использованием.

Препарат апотриптофаназы *E. coli* и другие реактивы для определения пиридоксальфосфата (см. Ю. В. Букин, А. В. Сергеев, с. 68).

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Всю работу, связанную с подготовкой ткани для анализа, проводят при 0—4°C. Навеску ткани (5—10 мг), взятую на микроторсионных весах с ценой деления 50 мкг, тщательно гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе с таким объемом буфера или раствора сахарозы, чтобы содержание ткани в гомогенате соответствовало приблизительно 1 мг в 1 мл. При определении активности фермента в экстрактах ткани гомогенат центрифугируют 15 мин при 10 000—25 000 g и для анализа используют надосадочную жидкость.

В пробы, содержащие 1 мл субстратной смеси (1 мкмоль пиридоксаля, 1 мкмоль АТФ и 0,02 мкмоль Zn^{2+}), вносят 0,2—1,0 мл гомогената или экстракта ткани и необходимое количество буфера до общего объема 2 мл. При использовании в качестве среды для гомогенизирования изотонического раствора сахарозы в пробы вносят 0,25 мл гомогената или экстракта ткани. Ферментативную реакцию начинают инкубацией проб при 37°C в течение 15—60 мин и останавливают путем прогрева проб на кипящей водяной бане в течение 3 мин. Контрольные пробы фиксируют аналогичным образом немедленно после внесения в субстратную смесь гомогената или экстракта ткани. Фиксированные пробы охлаждают и сохраняют при 0—4°C до последующего определения пиридоксальфосфата. Содержание пиридоксальфосфата в фиксированных пробах в течение 3—4 ч не снижается. Следует подчеркнуть, что процедуры, связанные с инкубацией, фиксацией, хранением проб и последующим определением пиридоксальфосфата, необходимо проводить в темноте или при красном свете для защиты пиридоксальфосфата от разрушения.

Для определения пиридоксальфосфата, образовавшегося в пробах во время инкубации, в систему с апотриптофаназой вносят 0,05—1,0 мл исследуемого раствора. В некоторых случаях при высокой активности пири-

доксалькиназы и длительной инкубации целесообразно перед определением пиридоксальфосфата разбавлять пробы в несколько раз буфером или дистиллированной водой. Буферная смесь, вносимая в систему с апотриптофаназой в количестве 1 мл, на определение пиридоксальфосфата не влияет.

Определение единицы активности пиридоксалькиназы и расчет активности фермента. За 1 единицу (Е) активности пиридоксалькиназы принимают образование 1 нмоля пиридоксальфосфата в 1 мин при 37 °С в стандартных условиях инкубации. Активность фермента выражают в Е в расчете на 1 г ткани. Удельную активность пиридоксалькиназы выражают в Е в расчете на 1 мг белка. Белок определяют методом Лоури.

Расчет активности пиридоксалькиназы производят по приведенным ниже формулам:

$$E/г \text{ ткани} = \frac{\Delta \text{пиридоксальфосфат (нг)} \cdot 2 \text{ мл} \cdot 1000 \text{ мг}}{t_{\text{мин}} \cdot 265 \cdot V \text{ мл} \cdot P \text{ мг}},$$

$$E/мг \text{ белка} = \frac{\Delta \text{пиридоксальфосфат (нг)} \cdot 2 \text{ мл} \cdot 1000 \text{ мкг}}{t_{\text{мин}} \cdot 265 \cdot V \text{ мл} \cdot P \text{ мкг}},$$

где 265 — относительная молекулярная масса пиридоксальфосфата; Δ пиридоксальфосфат (нг)/ t мин $\cdot$ 265 — прирост пиридоксальфосфата в пробах по сравнению с контролем в нмолях за 1 мин; P — количество ткани в пробах (в мг) или количество белка в пробах (в мкг); V — объем, взятый из пробы для определения пиридоксальфосфата.

Возможная ошибка метода при определении активности пиридоксалькиназы в параллельных пробах лежит в пределах $\pm 5\%$.

УСЛОВИЯ, ВЛИЯЮЩИЕ НА АКТИВНОСТЬ ПИРИДОКСАЛЬКИНАЗЫ

Оптимум рН действия фермента в гомогенатах тканей печени, мозга, почек и селезенки мышей находится около 5,8 (Ю. В. Букин, 1973); при рН 5,5 или 6,1 активность фермента заметно снижается по сравнению с максимальной. В стандартных условиях определения пиридоксалькиназы количество образовавшегося пиридоксальфосфата пропорционально содержанию белка в пробах в пределах от 20 до 100 мкг и времени инкубации

в пределах от 15 до 60 мин (Ю. В. Букин, 1973); при содержании в пробах более 1 мг белка гомогената или экстракта ткани удельная активность фермента резко снижается, по-видимому, в результате неспецифического связывания пиридоксальфосфата белком.

АМФ конкурентно тормозит пиридоксалькиназу, $K_i = 6,0 \cdot 10^{-5}$ М, (McCormick e. a., 1961). Мощными ингибиторами фермента являются гидразоны пиридоксала (McCormick, Snell, 1970), что исключает возможность определения активности пиридоксалькиназы в присутствии карбонильных реагентов, если субстратом служит пиридоксаль.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРИДОКСАЛЬКИНАЗЫ В ТКАНЯХ

В расчете на 1 г ткани активность пиридоксалькиназы в гомогенатах и экстрактах большинства тканей мышей практически одинакова. Удельная активность фермента в экстрактах тканей значительно выше, чем в гомогенатах, вследствие удаления в осадок инертных белков с весьма низкой удельной активностью пиридоксалькиназы. В печени мышей пиридоксалькиназа сосредоточена в основном в постмитохондриальной фракции клеток; митохондрии и ядра клеток печени отличаются весьма низкой активностью фермента (Ю. В. Букин, 1973).

Данные, полученные нами при определении активности пиридоксалькиназы в некоторых тканях у млекопитающих и человека, приведены в табл. 11.

К числу органов с наиболее высокой активностью фермента относятся почки, печень и мозг. В злокачественных новообразованиях у человека (эпендимобластома, гипернефرويدный рак, лимфоциты больных острым лейкозом) активность пиридоксалькиназы по сравнению с соответствующим контролем снижена (Ю. В. Букин, 1973). По нашим данным, активность фермента в печени и мозге животных и человека значительно повышается в процессе онтогенеза. Активность пиридоксалькиназы в печени животных зависит от режима питания и существенно возрастает при высоком содержании белка в рационе.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА

Объектом исследования могут служить различные ткани животных и человека, а также форменные элементы крови. Поскольку для проведения анализа достаточно

Активность пиридоксалькиназы в гомогенатах различных тканей животных и человека (Е/г ткани)

Исследуемая ткань	Мышь	Крыса	Человек
Мозг	$37,5 \pm 0,6$	$43,4 \pm 2,6$	5,4—45,9 (аутопсия)*
Печень	$40,0 \pm 0,9$	$56,4 \pm 11,6$	2,0—28,5 (аутопсия)
Почки	$52,9 \pm 3,8$	$84,6 \pm 2,0$	45,5—51,4 (биопсия)**
Селезенка	$19,1 \pm 0,9$	$25,2 \pm 1,5$	5,2—5,8 (аутопсия)
Легкие	$14,8 \pm 2,2$	$17,1 \pm 1,2$	9,4—11,2 (аутопсия)
Слизистая тонкого кишечника	$18,3 \pm 1,2$	$15,9 \pm 1,3$	16,9—18,4 (биопсия)
Поджелудочная железа	$16,9 \pm 1,9$	$18,3 \pm 2,5$	
Сердце	$5,1 \pm 0,3$	$4,8 \pm 1,0$	8,9—10,1 (аутопсия)
Бедренная мышца	$1,8 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,4$	1,8—3,2 (аутопсия)

* Серое вещество лобной доли головного мозга.

** Мозговой слой.

0,5—1,0 мг ткани, метод может быть использован в клинических условиях для определения активности пиридоксалькиназы в пунктатах костного мозга, печени, селезенки и других органов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СЕРИН-ОКСИМЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ В ТКАНЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А. В. СЕРГЕЕВ

Серин-оксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1) относится к числу содержащих пиридоксальфосфат ферментов, участвующих в обмене коферментных форм фолиевой кислоты, и катализирует обратимый перенос β -С-атома L-серина на тетрагидрофолиевую кислоту: $\text{H}_4\text{-фолат} + \text{L-серин} \rightleftharpoons 5,10\text{-метилен-H}_4\text{-фолат} + \text{глицин}$. 5,10-Метиллен-H₄-фолат, образующийся в результате реакции, служит донором одноуглеродного компонента при синтезе инозиновой кислоты, тимидилата и метионина. Известно, что серин-оксиметилтрансфераза принимает участие в распаде L-серина в митохондриях (Motokawa, Kikuchi, 1971).

ПРИНЦИП МЕТОДА

В основу метода положено определение активности серин-оксиметилтрансферазы в системе, сопряженной с 5,10-метилен-Н₄-фолатдегидрогеназой (КФ 1.5.1.5). Принцип этого метода был использован ранее при работе с очищенными препаратами серин-оксиметилтрансферазы (Schrach, Mason, 1963). 5,10-Метилен-Н₄-фолат, образующийся в вышеприведенной реакции, катализируемой серин-оксиметилтрансферазой, в присутствии НАДФ и 5,10-метилен-Н₄-фолатдегидрогеназы превращается в 5,10-метенил-Н₄-фолат, который может быть определен спектрофотометрически.

5,10-Метилен-Н₄-фолат + НАДФ → 5,10-метенил-Н₄-фолат + НАДФ · Н₂. Конечный продукт реакции 5,10-метенил-Н₄-фолат устойчив в кислой среде и обладает значительным максимумом поглощения при 355 нм, что обеспечивает надежность и достаточную чувствительность метода. Другие методы определения активности серин-оксиметилтрансферазы в тканях животных либо недостаточно точны (Vertino e. a., 1963)*, либо связаны с использованием ¹⁴С-серина и последующей сложной процедурой выделения радиоактивных продуктов реакции (Motokawa, Kikuchi, 1971).

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

L-серин; Н₄-фолат (получение см. ниже); пиридоксальфосфат; НАДФ; 5,10-метилен-Н₄-фолатдегидрогеназа, частично очищенный препарат (получение см. ниже).

0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7,8), содержащий 0,1 М 2-меркаптоэтанол.

45% раствор НСlО₄.

Получение Н₄-фолата

Н₄-фолат получают путем последовательного восстановления фолиевой кислоты и Н₂-фолата в присутствии NaHSO₃ и NaBH₄ соответственно с последующим выделением Н₄-фолата из реакционной смеси. Принцип очистки основан на том, что Н₄-фолат в отличие от фолиевой кислоты и Н₂-фолата может быть элюирован из колонки с ДЭАЭ-целлюлозой (ацетатная форма), разбавленной уксусной кислотой (Zakrzewski, Sansone, 1970).

Реактивы. Фолиевая кислота. 10% раствор аскорбата калия (pH 6,0). 2-Меркаптоэтанол. $\text{NaHSO}_3 \cdot \text{NaBH}_4$. ДЭАЭ-целлюлоза. 2 н. раствор KOH ; 2 н. раствор HCl . 1 М ацетатный буфер (pH 6,0). 0,75 М раствор уксусной кислоты. Абсолютный эфир.

Подготовка колонки с ДЭАЭ-целлюлозой. Колонку размером 22×250 мм заполняют 10 г ДЭАЭ-целлюлозы (ОН-форма). Через колонку пропускают 1 М ацетатный буфер (pH 6,0) до полного замещения OH^- на CH_3COO^- . Избыток ацетата удаляют, промывая колонку 0,5 л дистиллированной воды, затем пропускают через колонку 200 мл 1% раствора 2-меркаптоэтанола.

Процедура получения H_4 -фолата. 200 мг фолиевой кислоты суспендируют в 20 мл дистиллированной воды и растворяют, добавляя по каплям 2 н. раствор KOH . Раствор смешивают с 50 мл 10% раствора аскорбата калия (pH 6,0) и в смесь вносят 2 г NaHSO_3 . Смесь выдерживают 10 мин при комнатной температуре и затем охлаждают до 0°C . Раствор доводят до pH 2,8, добавляя 2 н. раствор HCl . Осадок собирают центрифугированием и вновь растворяют в 50 мл 10% раствора аскорбата калия (pH 6,0). Раствор доводят до pH 2,8, добавляя 2 н. HCl . Осадок H_2 -фолата отмывают 5 раз 0,005 н. HCl и растворяют в 10 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 7,6). Затем вносят в раствор 80 мг NaBH_4 и смесь выдерживают при комнатной температуре 10 мин. Далее для разрушения остатка NaBH_4 к раствору добавляют 1 мл 2 н. раствора HCl и через 2 мин pH раствора доводят до 7,0 с помощью 2 н. раствора KOH .

Реакционную смесь наносят на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. Проводят градиентную элюцию: 500 мл 1% раствора 2-меркаптоэтанола в смесителе и 500 мл 0,75 М раствора уксусной кислоты в резервуаре. За ходом элюции наблюдают, регистрируя поглощение раствора при вытекании из колонки. Элюционная кривая имеет три пика. Собирают основную фракцию, соответствующую третьему пику (всего 80—100 мл). Раствор лиофилизируют и сухой препарат обрабатывают 75—100 мл абсолютного эфира. Препарат содержит 1 моль 2-меркаптоэтанола на моль H_4 -фолата; относительная молекулярная масса 541 (Zakrzewski, Sansone, 1970). Препарат хранят в ампулах, из которых откачан воздух, или в атмосфере аргона при -20°C .

Получение препарата 5,10-метилен-Н₄-фолатдегидрогеназы

Частично очищенный препарат фермента получали по модифицированному методу, описанному ранее (Osborn, Huennepkens, 1957).

Реактивы и материалы. Н₄-фолат. Формальдегид. НАДФ.

0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7,8), содержащий 0,1 М 2-меркаптоэтанол.

0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 6,4).

Протаминсульфат.

Сульфат аммония. Сефадекс G-25 (средний).

Гель фосфата кальция (получение см. ниже).

Печень цыплят. Использовали свежемороженную печень, полученную от цыплят 1-го дня жизни; печень можно хранить при -20°C в течение 4 мес.

Приготовление геля фосфата кальция. 150 мл раствора хлорида кальция (132 г $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 1 л) разбавляют водой до 1600 мл и встряхивают со 150 мл раствора трехзамещенного фосфата натрия (152 г $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 1 л). Реакцию среды доводят до рН 7,4 разбавленной уксусной кислотой и образовавшийся осадок 4 раза промывают 20 л воды. Собранный центрифугированием осадок суспендируют в 1 л воды и оставляют стоять в течение месяца в темноте. Осадок геля, полученный центрифугированием, дважды промывают 0,5 л 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 6,4) и хранят в этом буферном растворе при 4°C .

Метод определения активности 5,10-метилен-Н₄-фолатдегидрогеназы. Метод основан на измерении количества 5,10-метенил-Н₄-фолата, который образуется в присутствии формальдегида, Н₄-фолата, НАДФ и фермента. Формальдегид в растворе быстро реагирует с Н₄-фолатом неферментативным путем, образуя 5,10-метилен-Н₄-фолат. Инкубационная смесь для определения активности фермента содержит: 5 мкмоль формальдегида, 1 мкмоль Н₄-фолата, 1 мкмоль НАДФ в 2 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,8), содержащего 0,1 М 2-меркаптоэтанол. Реакцию начинают внесением белка в объеме 0,05—0,1 мл и проводят в темноте в течение 5—10 мин при 37°C . Реакцию останавливают внесением в пробы 1 мл 45% HClO_4 . Контролем служат пробы, фиксированные HClO_4 сразу же после внесения в них

белка. Осадок отделяют центрифугированием и пробы фотометрируют при 355 нм. Количество образовавшегося 5,10-метенил-Н₄-фолата рассчитывают, принимая $\epsilon = 22\,000$ (Bertino e. a., 1963)*. За единицу активности 5,10-метилен-Н₄-фолатдегидрогеназы (Е) принимают количество ферментного белка, которое обеспечивает образование в стандартных условиях 1 нмоля 5,10-метенил-Н₄-фолата за 1 мин.

Очистка 5,10-метилен-Н₄-фолатдегидрогеназы. Все операции, связанные с очисткой фермента, проводят при 2—4 °С. 10 г печени гомогенизируют с десятикратным объемом 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,6). Гомогенат центрифугируют при 40 000 g в течение 40 мин. Надосадочную жидкость осторожно доводят до рН 6,5 с помощью 1 М раствора уксусной кислоты и добавляют по каплям 2,5 мл 2% раствора протамина сульфата. Раствор выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре и затем центрифугируют при 30 000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость с помощью 2 н. раствора КОН доводят до рН 8,0. К раствору небольшими порциями добавляют сухой (NH₄)₂SO₄ до 0,25 насыщения. К надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования раствора при 30 000 g в течение 15 мин, добавляют (NH₄)₂SO₄ до 0,45 насыщения. Осадок, полученный после центрифугирования, растворяют в 6 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 6,4) и наносят на колонку с сефадексом G-25 (средний), уравновешенным тем же буфером. К раствору белка, собранному после пропускания через колонку, добавляют не-

Таблица 12

Очистка 5,10-метилен-Н₄-фолатдегидрогеназы (пример опыта)

Этап очистки	Характеристика фракций			
	объем, мл	общая активность, Е	удельная активность белка, Е/мг	выход, %
Экстракт ткани	100	1980	18	100
Обработка протамин-сульфатом	98	1850	22	94
Осаждение сульфатом аммония (0,25—0,45 насыщения)	8	1300	36	66
Элюция с геля фосфата кальция	20	780	73	40

большими порциями гель фосфата кальция — 50—60 мг в пересчете на сухую массу фосфата кальция. Смесь перемешивают в течение 5 мин и центрифугируют. Обработку надосадочной жидкости гелем повторяют до полного извлечения фермента из раствора. Осадки, собранные при центрифугировании, объединяют и активный белок элюируют с геля 20 мл 0,2 М К-фосфатного буфера (рН 7,6). Ход очистки и выход фермента представлены в табл. 12. Препарат 5,10-метилен-Н₄-фолатдегидрогеназы содержит следы серин-оксиметилтрансферазы. При хранении препарата при —20 °С фермент активен в течение 3—4 нед.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СЕРИН-ОКСИМЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Навеску ткани гомогенизируют с семикратным объемом 0,1 М К-фосфатного буфера (рН 7,8). Гомогенат центрифугируют при 40 000 g в течение 40 мин и надосадочную жидкость используют для определения активности фермента.

Инкубационная смесь в общем объеме 2 мл 0,1 М К-фосфатного буфера (рН 7,8) содержит: 5 мкмоль L-серина, 1 мкмоль Н₄-фолата, 1 мкмоль НАДФ, 0,2 мкмоль пиридоксальфосфата, 0,2 мл препарата 5,10-метилен-Н₄-фолатдегидрогеназы с удельной активностью около 70 Е/мг, 10 мкмоль 2-меркаптоэтанола. Реакцию начинают внесением в пробы с инкубационной смесью 0,05—0,1 мл экстракта испытуемой ткани и проводят в течение 5—10 мин при 37 °С. Останавливают реакцию добавлением к пробам 1 мл 45% раствора НСlO₄. Контролем служат пробы, которые фиксируют раствором НСlO₄ сразу после внесения в них экстракта ткани. Через 15 мин после остановки реакции осадок отделяют центрифугированием и в надосадочной жидкости определяют количество образовавшегося 5,10-метенил-Н₄-фолата путем измерения оптической плотности при 355 нм.

За единицу активности серин-оксиметилтрансферазы (Е) принимают количество ферментного белка, обеспечивающего в стандартных условиях образование 1 нмоля 5,10-метенил-Н₄-фолата за 1 мин. Активность фермента выражают в Е на мг белка или в Е на г ткани. Содержание белка в пробах определяют по методу Лоури. При

изучении условий определения активности фермента в тканях печени мышей и крыс нами установлено, что скорость образования конечного продукта реакции прямо пропорциональна количеству внесенного в пробы белка ферментного препарата в пределах 0,5—1,5 мг и времени инкубации в пределах 5—10 мин. При соблюдении описанных условий определения активности фермента ошибка метода находится в пределах $\pm 4\%$.

Активность серин-оксиметилтрансферазы в ткани печени беспородных мышей и крыс, определенная вышеописанным способом, составляет соответственно $16 \pm 1,14$ Е/г и $14,6 \pm 0,98$ Е/г. Удельная активность фермента в субклеточных структурах печени мыши составляет в ядрах 5,2 Е/мг, в митохондриях — 21 Е/мг, в микросомах — 4,8 Е/мг.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА

Метод может быть использован для определения активности серин-оксиметилтрансферазы в различных тканях млекопитающих и человека. Поскольку для определения активности фермента достаточно 5—10 мг ткани, метод может быть использован в клинике для определения активности серин-оксиметилтрансферазы в небольших порциях ткани, получаемых при биопсии, и в форменных элементах крови.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АРГИНИНА В МОЧЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Л. П. АЛЕКСЕЕНКО

В мировой литературе описаны случаи наследственного заболевания, сопровождающегося высоким содержанием аргинина в крови, спинномозговой жидкости и моче (Peralta, 1965). Заболевание связано с врожденной недостаточностью аргиназы. При гомозиготном носительстве оно протекает чрезвычайно тяжело. Поскольку заболевание сопровождается гипераргининурией, то оно, очевидно, может быть диагностировано на основании данных лабораторного анализа. Хроматографические методы определения аргинина требуют специального доро-

гостоящего оборудования или ряда громоздких процедур (упаривание мочи, обессоливание и пр.) Специфическая цветная реакция на аргинин (реакция Сакагучи) не может быть использована для непосредственного выявления аргинина в моче, поскольку мочеви́на препятствует образованию окрашенного продукта реакции.

Для определения содержания аргинина в моче и сыворотке крови мы разработали достаточно простой, удобный и специфичный микрометод, исключаящий предварительное упаривание и обессоливание мочи.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Мочу или безбелковый фильтрат сыворотки наносят на хроматографическую бумагу и пропускают абсолютный этанол в течение ночи. Аргинин в этих условиях остается в местах нанесения, а мочеви́на и трихлоруксусная кислота вымываются. Пробы экстрагируют щелочью и проводят реакцию Сакагучи по ранее описанному нами способу (Л. П. Алексеенко, В. Н. Орехович, 1971), включающему стабилизацию цветного продукта реакции.

Метод пригоден для массового обследования больных с целью выявления гипераргининурии. Он требует минимальных количеств мочи и (или) сыворотки (0,1—0,2 мл). Поскольку в нормальной моче содержание аргинина очень мало и не зависит от диеты, первоначальное обследование может быть ограничено только анализом мочи.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

96% этанол должен быть обезвожен кипячением с прокаленным сульфатом меди или окисью кальция и перегнан.

1-Нафтол, очищенный перекристаллизацией из спирта. Готовят 0,2% раствор в абсолютном этаноле, хранят в темной склянке.

Гипобромит — 1 мл брома растворяют в 250 мл 1 н. растворе NaOH (исходный раствор), хранят в течение месяца в холодильнике.

20% раствор 2-тиодигликоля в 0,25 н. растворе NaOH.

5 н. раствор KOH и 0,25 н. раствор NaOH.

Аргинин·НСl (х. ч., относительная молекулярная масса 210,7); 4,4 мг растворяют в 2 мл воды (исходный стандартный раствор).

Хроматографические камеры. Хроматографическая бумага. Спектрофотометр СФ-4 или фотоколориметр типа ФЭК, позволяющий измерять оптическую плотность в области 520 нм.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

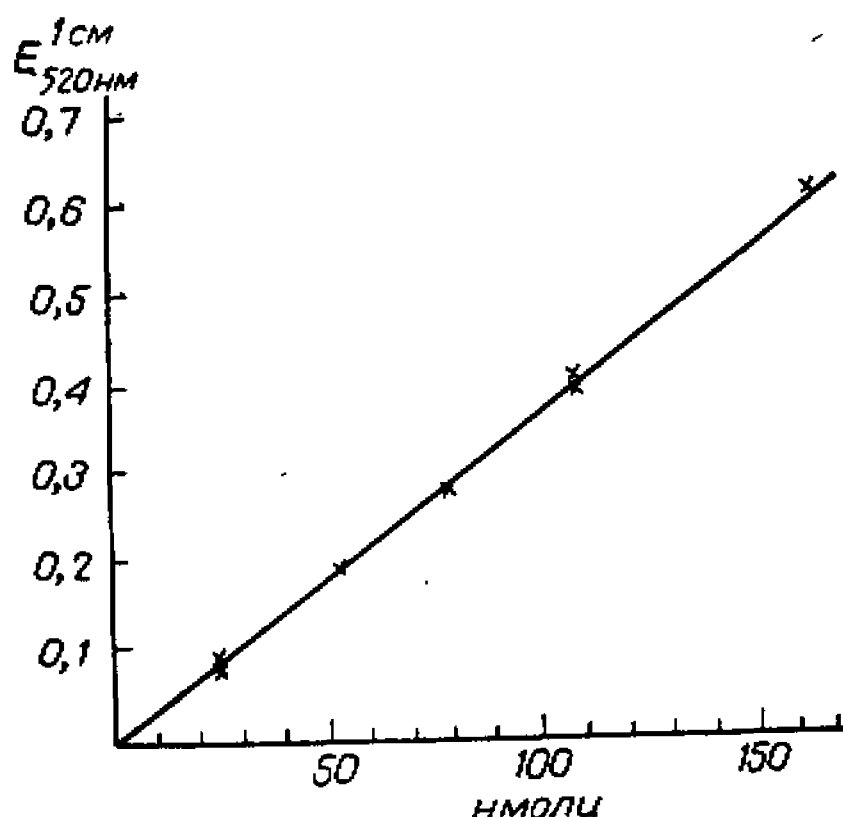
На листах хроматографической бумаги длиной 15 см и шириной 60 см (ширина определяется размером хроматографической лодки), отступив от края 5 см, вычерчивают по ширине листа квадраты 2×2 см. В центр каждого квадрата помещают по 0,01 мл 5 н. раствора КОН и, не дожидаясь высыхания щелочи, наносят на образовавшиеся пятна по 0,01 мл мочи, безбелкового центрифугата сыворотки или раствора аргинина для построения калибровочной кривой. Моча в предварительной обработке не нуждается, а белки сыворотки следует осадить добавлением к сыворотке равного объема 10% раствора трихлоруксусной кислоты и отцентрифугировать.

В одну точку можно нанести несколько порций анализируемого раствора по 0,01 мл, высушивая каждый раз пятно от предыдущей порции. Затем бумагу помещают в камеру, закрепляют в хроматографической лодочке и промывают пропусканием абсолютного этанола в течение ночи.

Бумагу сушат в токе воздуха и погружают в 0,05% раствор 1-нафтола в абсолютном этаноле (раствор готовят непосредственно перед употреблением из 0,2% исходного раствора). Бумагу снова сушат до полного испарения этанола. Вырезают квадраты с нанесенными пробами, разрезают их на несколько частей и помещают в пробирки (желательно широкие, диаметром 18—20 мм). Мелко нарезать бумагу не следует, так как при экстракции щелочью она может слишком размокнуть. В пробирки наливают по 3 мл щелочи, встряхивают, добавляют по 0,4 мл раствора гипобромита, приготовленного перед употреблением разведением исходного раствора 0,25 н. NaOH в 10 раз. Мгновенно развивается розовое окрашивание. Через 20—30 с после добавления гипобромита и энергичного встряхивания к пробам до-

Рис. 5. Калибровочный график для определения концентрации аргинина. Конечный объем пробы 3,6 мл.

На ординате — оптическая плотность при 520 нм; на абсциссе — количество аргинина, содержащегося в нанесенном на хроматограмму объеме, в нанолях.



бавляют 0,2 мл 20% раствора 2-тиодигликоля в 0,25 н. растворе NaOH. Пробы снова встряхивают. Измеряют оптическую плотность при 520 нм против контрольной пробы. Контрольной пробой служит экстракт из квадрата бумаги, на который была нанесена только щелочь.

С помощью калибровочной кривой значения оптической плотности при 520 нм переводят в количество нмолей аргинина в пробе и далее рассчитывают концентрацию аргинина в исследуемом материале. Калибровочная кривая, представленная на рис. 5, построена на основании нескольких разведений исходного стандартного раствора аргинина в интервале 27—165 нмолей в пробе (4,7—28,7 мкг в 10 мкл). Проводили по пять параллельных определений для каждого разведения.

При освоении метода следует иметь в виду:

1. При промывании хроматограммы этанолом растворимая в абсолютном этаноле мочеви́на уносится током растворителя, нерастворимый аргинин остается адсорбированным на бумаге в месте нанесения. Но если в пробах присутствует трихлоруксусная кислота, способная образовывать с аргини́ном солеобразные соединения, то при пропускании этанола, на старте, кроме основного пятна аргинина, образуется второе пятно, также содержащее аргинин, идущее вслед за трихлоруксусной кислотой. Трихлоруксусная кислота в этих условиях имеет R_f 0,77, а второе пятно аргинина — R_f 0,53. Чтобы избежать этого «раздвоения», мы и предлагаем наносить пробу на бумагу, предварительно смоченную 5 н. рас-

Таблица 13

Воспроизводимость результатов определения содержания аргинина при различных экспериментальных условиях

Состав определяемых проб	Содержание аргинина (нмоль/10 мкл)		
	нанесено на бумагу	обнаружено $M \pm m$ (число определений)	количество обнаруженного аргинина по отношению к добавленному, %
Раствор аргинина в воде	171	$175 \pm 0,9$ (6)	102
	171	$171 \pm 0,5$ (6)	100
	160	$154 \pm 0,5$ (5)	96
	110	$107 \pm 0,5$ (6)	97
	55	60 (6)	109
Раствор аргинина, 2% раствор сывороточного альбумина, 2,5% раствор ТХУ (центрифугат после осаждения белков)	160	$157 \pm 1,0$ (5)	98
	110	$107 \pm 0,3$ (4)	97
	55	58 (6)	105
Сыворотка крови человека, раствор аргинина, 6% раствор ТХУ (центрифугат после осаждения белков)	300	$282 \pm 0,6$ (5)	94 94 95 95 97
	300	$282 \pm 0,6$ (6)	
	300	$285 \pm 0,5$ (6)	
	300	$285 \pm 0,7$ (5)	
	300	$290 \pm 0,7$ (6)	
Раствор аргинина в моче	250	$234 \pm 0,4$ (4)	94
	200	$190 \pm 0,4$ (5)	95
	153	$153 \pm 0,3$ (5)	100
	100	$103 \pm 0,2$ (5)	103
	50	50 (3)	100

твором КОН в месте нанесения. На пятно от 0,01 мл КОН можно последовательно нанести 0,05—0,06 мл и более испытуемого раствора. Однако делать это следует так, чтобы последующие порции жидкости не расплывались за границы пятна щелочи. При выполнении этого условия аргинин в токе этанола остается на старте и далее проявляется в виде компактного пятна, несмотря на то что границы пятна щелочи довольно сильно размываются по длине бумаги.

2. Кроме следовых количеств аргинина в нормальной моче находится в значительном количестве и другое вещество, также дающее окрашенный продукт при реакции Сакагучи — гликоциамин или гуанидинуксусная

кислота. При пропускании этанола в течение ночи гликоциамин, смещаясь со стартовой линии, отделяется от аргинина и не мешает его дальнейшему определению.

3. Бумагу с нанесенными пробами следует как можно меньше держать на свету, так как показано, что аргинин при освещении разрушается. После обработки бумаги 0,05% раствором 1-нафтола ее следует сразу же после полного испарения этанола в токе воздуха разрезать, экстрагировать и провести реакцию Сакагучи.

В табл. 13 приведены данные по воспроизводимости результатов определения аргинина как в водных растворах, так и в моче (при добавлении аргинина), а также в трихлоруксусных центрифугатах после осаждения белка в растворе сывороточного альбумина или в сыворотке. Данные обработаны методом вариационной статистики и представляют собой среднее значение из 5—6 параллельных проб. Определяемый аргинин составляет 95—100% от добавленного.

Содержание аргинина в нормальной моче и плазме крови здорового человека очень мало. По данным Stein (1953), Stein и Moore (1954), в суточной моче (1,5—2,0 л) содержится 10—20 мг аргинина, а в плазме крови — 1,5 мг/100 мл. Но при врожденном дефекте образования мочевины, связанном с недостаточностью аргиназы, содержание аргинина в моче возрастает в 250—300 раз, а в плазме — в 10 раз по сравнению с нормой.

МЕТОДЫ ДИНАМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ pH, pNa⁺, pK⁺ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ И ТКАНЯХ ОРГАНИЗМА

Е. А. ЮМАТОВ

Благодаря развитию ионографии и микроэлектродной техники стало возможным динамическое определение активности ионов водорода, натрия, калия и некоторых других ионов в жидкостях и тканях организма.

Ионография — прямой, непрерывный, не нарушающий процесса и неповреждающий тканей потенциометрический метод измерения и регистрации активности ионов в биологических структурах при помощи катион-селективных электродов.

При изучении катионов в биологических системах оказалось, что метод ионографии обладает целым рядом уникальных преимуществ перед другими аналитическими методами, такими, например, как колориметрия, фотометрия. Самое главное преимущество — это возможность измерять с высокой точностью активность ионов H^+ и щелочных катионов K^+ , Na^+ *in vivo* или *in situ* без повреждения тканей. Важное достоинство метода состоит также в том, что он позволяет проводить динамическое измерение активности ионов. Непрерывность измерения создает возможность обнаружить в изучаемом процессе ряд фаз, которые при дискретном измерении могут остаться незамеченными. К числу положительных свойств метода следует отнести способность электродов реагировать не на концентрацию, а на активность катионов. Электроды нечувствительны к окислительно-восстановительным потенциалам, на их показания не влияют перенос электронов и напряжение кислорода. Присутствие белков в среде не оказывает на них повреждающего действия.

Электроды пригодны для работы в коллоидных системах, просты в обращении, не требуют периодической очистки, обладают достаточной стабильностью, воспроизводимостью результатов, мгновенной установкой показаний.

ПРИНЦИП МЕТОДА И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ

Метод основан на том, что на электродах, изготовленных из специального стекла, возникает потенциал, величина которого зависит от активности определенного вида ионов в окружающей среде.

В настоящее время получено стекло, избирательно чувствительное к ионам водорода, натрия, калия, и разрабатываются составы стекол для двухвалентных катионов, а также для анионов.

Теория катионселективных электродов, разработанная Б. П. Никольским (1937—1958) и его учениками (Б. П. Никольский и др., 1958), а также Эйзенманом (1964), позволяет установить зависимость величины потенциала от активности ионов, а также дает возможность представить механизм «функции стекла», что создало предпосылки для разработки стекол новых соста-

вов. Величина потенциала стеклянного электрода (E) описывается уравнением:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln (a_H + K_{H/Na} \cdot a_{Na}); a_e = (a_H + K_{H/Na} \cdot a_{Na}),$$

где R , T , F , n — общепринятые обозначения; a_e — активность ионов снаружи стеклянной мембраны; E_0 — стандартный потенциал, зависящий от состава стекла и активности внутриэлектродного электролита, $E = E_0$, при $a_H + K_{H/Na} = 1$. Уравнение описывает потенциал, который оказывается зависимым от активности двух ионов — Na^+ и H^+ . Степень селективности стекла определяется величиной $K_{H/Na}$ — константой равновесия ионообменной реакции, зависящей от состава стекла и характеризующей различие в прочности связей обменивающихся ионов в стекле и равновесном растворе. $K_{H/Na}$ — рассчитывается по закону действующих масс для реакции ионного обмена. Для водородного стекла $K_{H/Na}$ равна 10^{-12} — 10^{-15} , так что потенциал, зависящий от ионов натрия, ничтожно мал и поэтому электрод избирательно чувствителен к ионам водорода.

Уравнение, описывающее потенциал чувствительных к ионам натрия или калия электродов, имеет вид:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln (a_{Na} + K_{Na/K} \cdot a_K),$$

где a_{Na} , a_K — активность соответствующих ионов в растворе. При $K_{Na/K} < 1$ электрод приобретает специфичность к Na^+ , а при $K_{Na/K} > 1$ — к K^+ . Для электрода, чувствительного к ионам натрия, достигнута высокая степень селективности — $K_{Na/K}$ около 10^{-2} — 10^{-4} . Чувствительные к ионам калия электроды обладают низкой избирательностью, $K_{Na/K}$ около 4—10, что не позволяет использовать их в среде с высоким содержанием натрия. Крутизна электродной функции характеризует сдвиг потенциала при изменении pH , pNa^+ , pK^+ на единицу. Крутизна $\frac{RT}{nF}$ равна 58 мВ при 20 °С.

Натриевая и калиевая функции стеклянных электродов зависят от концентрации водородных ионов. Однако практически чувствительность этих электродов к водородным ионам проявляется лишь при крайних значениях pH . pH среды в диапазоне 2—12 практически не влияет

на показания электрода, чувствительного к ионам натрия. Таким образом, измерение соответствующими электродами pNa^+ и pK^+ в биологических объектах практически не требует поправки на pH .

Измерить потенциал на электроде, отражающий активность соответствующего иона в растворе, означает сравнить его с постоянным по величине потенциалом другого электрода. В качестве электрода сравнения обычно используют каломельный или хлоросеребряный электроды, обладающие свойством сохранять постоянным свой собственный потенциал.

В электродной цепи, кроме функционально зависимо-го от активности ионов потенциала, существует ряд дополнительных потенциалов, дрейф которых может маскировать истинное значение измеряемой величины, поэтому электродная схема строится с расчетом максимально возможной стабилизации всех посторонних потенциалов, существующих в цепи — жидкостных, диффузионных, асимметрии. Для этой цели в конструкцию внешнего электрода сравнения вводят полиэтиленовую трубочку диаметром 1—5 мм, заполненную агар-агаром, приготовленным на растворе Рингера.

В тех случаях, когда невозможно устранить влияния посторонних потенциалов, например потенциалов биоэлектрической активности мозга для измерения истинного значения pH , pNa^+ или pK^+ , необходимо контролировать дрейф этих потенциалов. С этой целью применяют дополнительную электродную пару, в которой вместо катионселективного электрода используют внешний электрод сравнения.

Показания катионселективных электродов зависят от температуры. В связи с этим важно стабилизировать температуру в измеряемом субстрате и по возможности вводить коррекцию на температуру, которая предусмотрена в схеме pH -метра. Температурная компенсация возможна, если в приборе выставлены координаты изопотенциальной точки применяемых электродов. Однако погрешность измерения, связанная с изменением температуры, очень мала, в среднем около 0,5—0,7 мВ на $1^\circ C$, что соответствует не более 0,01 pH на $1^\circ C$. По данным Portnoy и соавт. (1963), колебания температуры, связанные с изменением кровотока, не превышают $0,5^\circ C$, а следовательно, не оказывают существенного влияния на показания катионселективных электродов.

ЭЛЕКТРОДЫ

В биологических исследованиях применяют различные типы электродов, выбор которых определяется характером эксперимента. Луковичные и мембранные электроды используют для измерения активности на поверхности ткани или органа, а также в жидкостях. Проточные электроды обычно используют для измерения активности ионов в движущихся жидкостях, например в крови. Копьевидный электрод применяют для регистрации внутритканевой активности ионов.

Электрод состоит из корпуса, изготовленного из высокоомного стекла (стекло с высоким омическим сопротивлением), к которому припаивают стеклянную мембрану из селективного стекла. Изнутри электрод заполняют стандартным электролитом. Внутренним электродом сравнения служит помещенный в электролит Ag/AgCl-электрод. Снаружи электрод герметически запечатывают. Сопротивление электрода составляет не менее 10^9 Ом. Активность ионов внутриэлектродного электролита остается постоянной и измеряемый потенциал, снимаемый с этих электродов, зависит только от активности ионов в окружающей электрод среде.

Перед употреблением стеклянный электрод выдерживают в течение суток в растворе, тождественном внутриэлектродному, например pH-электроды в 0,1 н. растворе HCl, рNa⁺-электроды в 0,1 н. растворе NaCl. Это делают для стабилизации специфических функций стекла, повышения степени его селективности, а также для стабилизации потенциала асимметрии, который возникает на поверхности стеклянной мембраны вследствие неодинаковой кривизны ее внутренней и наружной поверхности. Величина потенциала асимметрии может быть определена при погружении электрода в раствор, тождественный внутриэлектродному. В промежутках между опытами электроды хранят либо в этих же растворах, либо в их парах.

Для динамического измерения активности ионов в небольших объемах жидкости и на поверхности тканей могут быть использованы мембранные электроды. Изготовление этих электродов включает несколько этапов:

1. Стеклянные капилляры из высокоомного стекла БД-1 диаметром 3 мм разрезают на участки длиной 4—6 см.
2. Один из концов капилляра с торцевой стороны шли-

фуют, а края другого конца оплавливают в пламени горелки и несколько развальцовывают. 3. Из катион-селективного стекла выдувают тонкостенный шар. 4. Затем нагретым зашлифованным концом подготовленного капилляра вырезают кружочек селективной мембраны, который припаивают к капилляру, делая из него как бы донышко. Толщина мембраны — 20—100 мкм. 5. При помощи тонкой пипетки электроды заполняют электролитом, поверх него наносят слой вазелинового масла для предотвращения испарения электролита. Внутренним электродом сравнения служит помещенная во внутриэлектродный электролит хлоросеребряная проволока. Электроды выдерживают в растворе, тождественном внутриэлектродному, а затем отбирают по крутизне электродной функции, стабильности и воспроизводимости показаний.

Широкое распространение в биофизических и физиологических исследованиях последних лет получили катионселективные микроэлектроды, которые оказались особенно удобными для измерения активности катионов в живой ткани и даже цитоплазме изолированных клеток. Впервые эти электроды в виде рН-микроэлектродов были изготовлены Caldwell (1954, 1958). С тех пор созданы различные конструкции селективных микроэлектродов, в которых диаметр чувствительного кончика значительно уменьшен — от 150 до 50—30 и даже до 1—2 мкм.

МИКРОЭЛЕКТРОДНЫЙ МЕТОД ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ИОНОВ

Достоинство микроэлектродного метода потенциометрического определения рН и других ионов заключается в том, что селективные микроэлектроды позволяют локально в максимально физиологических условиях исследовать в динамике активность ионов без существенного повреждения тканей и одновременно с измерением других показателей.

Чтобы функционировать и быть стабильным, стеклянный рН-микроэлектрод должен иметь постоянную по площади чувствительную поверхность на конце, электрическое сопротивление которой должно быть ниже, чем сопротивление других частей электрода. Чтобы предотвратить шунтирование потенциала, кончик микроэлектрода должен быть запаян. Различия в конструкции мик-

роэлектродов главным образом определяются способом изоляции нечувствительной части электрода. Однако если достигнут определенный успех в создании селективных электродов с минимальным размером чувствительного кончика (1—2 мкм), то достаточно надежной и простой в изготовлении изоляции получить не удавалось.

pH-, pNa⁺-, pK⁺-микроэлектроды, изготавливаемые нами (рис. 6), представляют собой микропипетку с диаметром кончика от 5 до 50 мкм и длиной чувствительной части 10—15 мкм. На всем протяжении, кроме кончика, селективная микропипетка изолируется способом, представляющим собой модификацию метода Кхури и Энзенмана (Khuri, 1967). Процедура изготовления микроэлектродов состоит в следующем. Из капилляров катионселективного стекла вытягивают микропипетку, которую для заполнения опускают концом в соответствующий электролит. Затем кончик микропипетки запаивают. Лишнюю часть столбика электролита в электроде испаряют при приближении спирали на микрокузнице Фонбрюна. С тупого конца в микропипетку шприцем вносят вазелиновое масло, а затем перемещением нагретой спирали вдоль конца пипетки добиваются образования сплошной масляной пленки на поверхности электролита. После этого приступают к вставлению внутрь более тонкого пирексового микроэлектрода, предварительно заполненного тем же электролитом. Под микроскопом продвигают пирексовую микропипетку через слой масла до погружения ее открытого кончика в столбик электролита. Обе пипетки с тупого конца скрепляют между собой расплавленным пицеином. Таким образом, рабочей частью электрода является поверхность, соприкасающаяся изнутри со столбиком электролита, а отведение по-

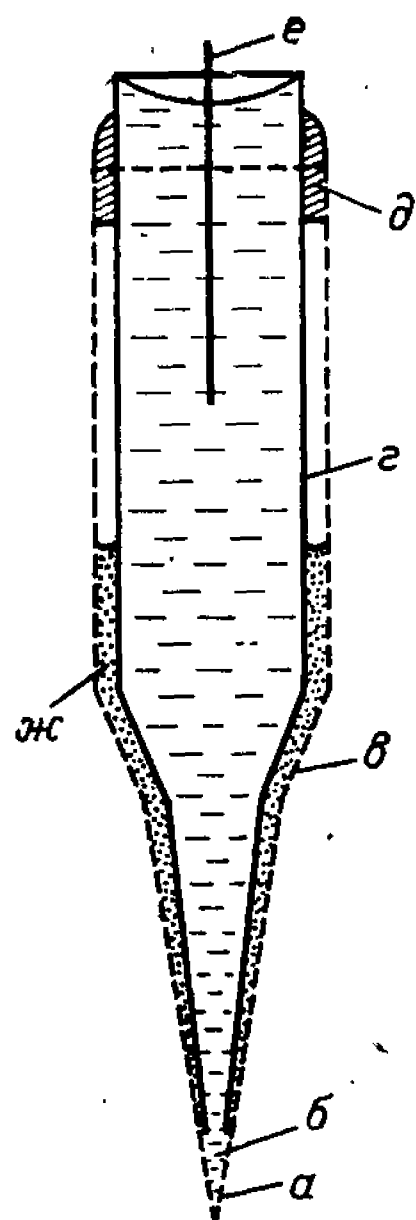


Рис. 6. Конструкция катионселективного микроэлектрода.

а — чувствительный кончик; б — внутри-электродный электролит; в — микропипетка из катионселективного стекла; г — микропипетка из пирекса; д — пицеин; е — Ag/AgCl-электрод; ж — вазелиновое масло.

тенциала осуществляется с помощью внутренней пирексовой микропипетки. Слой вазелинового масла надежно изолирует нерабочую поверхность микроэлектрода. Готовые микроэлектроды выдерживают в соответствующем электролите в течение суток, а затем хранят над ним. Отбор и калибровку электродов производят по буферным растворам. Микроэлектрод считается годным, если кривизна его электродной функции соответствует 58—56 мВ на 1 ед. рН, рNa⁺, рK⁺ при 20 °С, дрейф не превышает 0,02 рН за час.

В качестве внутреннего электрода сравнения катион-селективных микроэлектродов использовали хлоросеребряный электрод. Электродную пару опускали в ткань (например, мозга) так, чтобы кончик катионселективного микроэлектрода находился в ткани, а агар-агаровый электролитный ключ — на ее поверхности в непосредственной близости от микроэлектрода. Посторонние потенциалы регистрируются вместе с потенциалом, отражающим изменение активности ионов. Чтобы измерить истинное значение рН, рNa⁺, рK⁺, необходимо контролировать дрейф посторонних потенциалов. Для этой цели применяют электродную пару, соединенную со входом рН-метра, в которой вместо катионселективного микроэлектрода используют пирексовый микроэлектрод. Расположение электродной пары для записи контрольного потенциала обычно аналогично положению электродов для измерения рН ткани мозга.

Контроль дрейфа посторонних потенциалов можно проводить как синхронно с измерением активности ионов, так и последовательно. Первый способ более удобен, поскольку в этом случае можно получить автоматическую коррекцию, если подать сигналы (предварительно поменяв полярность одного из них) с выхода рН-метров, измеряющих контрольный потенциал и активность ионов, на выход регистрирующего прибора. В тех случаях, когда синхронная запись почему-либо неудобна, можно измерять контрольный потенциал в отдельной серии опытов в тех же экспериментальных условиях, что и при измерении рН, рNa⁺, рK⁺. Если в этом случае будет наблюдаться сдвиг контрольного потенциала, то его необходимо вычесть из величины рН, рNa⁺, рK⁺.

Динамическую регистрацию рН проводили при помощи рН-метра ЛПУ-01. В схему последнего могут быть внесены изменения, которые позволяют расширить шкалу

в физиологическом диапазоне рН, так что 0,01 ед. рН будет соответствовать 1 делению шкалы. Описанный метод позволяет динамически измерять рН и активность других ионов в биологических средах и тканях организма с точностью до второго десятичного знака.

В области биохимических исследований динамическое измерение активности ионов H^+ , Na^+ и K^+ в биологических средах может быть использовано при решении ряда задач, таких, как титрование малых количеств белковых растворов, определение активности некоторых ферментов (ацетилхолинэстеразы и др.), изучение ионных процессов в суспензии митохондрий и других внутриклеточных структур.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ

Е. В. РАМЕНСКИЙ

Гликогенфосфорилаза (1,4-D- α -глюкан: ортофосфат- α -глюкозилтрансфераза, КФ 2.4.1.1) катализирует фосфоролиз гликогена согласно уравнению:



Реакция фосфоролиза обратима. Однако в организме гликогенфосфорилаза катализирует именно расщепление гликогена, поскольку образовавшийся глюкозо-1-фосфат непрерывно выводится из реакционной смеси, попадая в сферу действия гликолитических ферментов.

Определение активности гликогенфосфорилазы может быть осуществлено различными способами. Метод рН-статирования, основанный на различии pK_a неорганического фосфата и глюкозо-1-фосфата, позволяет проследить как превращение неорганического фосфата в глюкозо-1-фосфат, так и обратную реакцию (Palter, Lukton, 1973). Он особенно рекомендуется для определения высоких концентраций чистого фермента.

На измерении скорости прямой реакции фосфоролиза гликогена основан метод определения активности гликогенфосфорилазы в присутствии двух ферментов: фосfogлюкомутазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Helmreich, Cori, 1964). Первый фермент катализирует изомеризацию глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат, а второй принимает участие в окислении субстрата в

присутствии НАДФ, превращая его в восстановленную форму НАДФ·Н. Количество НАДФ·Н определяют спектрофотометрически.

Однако бóльшая часть методов определения активности гликогенфосфорилазы связана с использованием обратной реакции — синтеза гликогена под действием этого фермента. К этой группе относится классический метод Кори (Illingworth, Cori, 1953), который положен в основу описанного ниже метода. Была предложена модификация метода Кори, в которой ферментативная реакция в присутствии высокой концентрации глюкозо-1-фосфата следует кинетике нулевого порядка (Hedrick, Fischer, 1965). В дальнейшем был разработан автоматический вариант последнего метода (Haschke, Heilmeyer, 1972). Возможно также определение активности фосфорилазы методом дифференциальной спектрополяриметрии (Mason, Fasella, 1971). Описан метод определения активности гликогенфосфорилазы, основанный на включении меченой C^{14} -глюкозы из C^{14} -глюкозо-1-фосфата в гликоген (Wang, Esmann, 1972). Гликоген осаждают спиртом, отделяют на бумажном фильтре, после чего и определяют его радиоактивность.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В методе Кори определяют освобождающийся в результате реакции фосфоролиза гликогена неорганический фосфат. Метод используют как для титрования активной формы фермента (фосфорилазы а), так и для измерения активности его неактивной формы (фосфорилазы б), которая осуществляет катализ только при добавлении в реакционную смесь аденозин-5'-фосфата, АМФ. В смесь, содержащую фермент в буферном растворе, вносят гликоген, глюкозо-1-фосфат, в случае фосфорилазы б также и АМФ. Через определенные промежутки времени отбирают пробы и методом Фiske — Суббароу определяют в них содержание неорганического фосфата (Умбрейт и соавт., 1951). Освободившийся неорганический фосфат в присутствии сильной кислоты образует с молибдатом аммония интенсивно желтую соль $(NH_4)_3H_4[P(Mo_2O_7)_6]$. Фосфомолибдат аммония восстанавливается далее в присутствии эйконогена (натриевой соли 1-амино-2-нафтолсульфоновой кислоты) до ярко-синего продукта, концентрацию которого измеряют фотометрически.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

500 мл 40 мМ раствора 2-глицерофосфата, содержащего 30 мМ цистеина гидрохлорида (рН 6,0 или 6,8).

5 мл 4% раствора гликогена.

5 мл 64 мМ раствора глюкозо-1-фосфата, подкисленного до рН 6,0 или 6,8. Для определения активности фосфорилазы б в этот раствор добавляют 4 мМ АМФ, 1 л 0,0735 н. раствора H_2SO_4 .

200 мл 2,5% раствора молибдата аммония в 5 н. растворе H_2SO_4 . Соль растворяют в воде, а затем добавляют необходимое количество концентрированной кислоты.

0,25% раствор эйконогена в 14,6% растворе NaHSO_3 , содержащем также Na_2SO_3 в концентрации 0,625%. 0,5 г чистого эйконогена растворяют в 195 мл чистого 15% раствора бисульфита натрия, затем прибавляют 5 мл 25% раствора сульфита натрия. Раствор хранят в темной посуде на холоду.

Рекомендуется следующий метод очистки сильно окрашенного препарата эйконогена: 15 г эйконогена растворяют в 1 л воды, нагретой до 90°C, прибавляют 150 г NaHSO_3 и 10 г Na_2SO_3 . Раствор охлаждают и фильтруют. К фильтрату добавляют 10 мл концентрированной HCl , выпавший осадок отделяют центрифугированием, промывают водой, затем спиртом и высушивают в эксикаторе в темноте. Высушенный до исчезновения запаха спирта препарат также хранят в темноте.

Потенциометр со стеклянным электродом, ультратермостат, спектрофотометр (например, СФ-4А) или фотоэлектроколориметр; настольная центрифуга на 8000—10 000 об/мин (до 6000 g).

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

К 0,4 мл раствора фермента в буфере, содержащем 40 мМ 2-глицерофосфат и 30 мМ цистеин (рН 6,0 или 6,8), добавляют 0,2 мл 4% раствора гликогена, инкубируют 2—3 мин при 30°C. Одновременно в том же термостате прогревают раствор глюкозо-1-фосфата или глюкозо-1-фосфата, содержащего АМФ. Реакцию начинают внесением в пробу 0,2 мл глюкозо-1-фосфата или 0,2 мл глюкозо-1-фосфата, содержащего АМФ. Конечные концентрации компонентов реакционной смеси таковы: 15 мМ цистеин, 20 мМ 2-глицерофосфат, 1% гликоген,

16 мМ глюкозо-1-фосфат, 1 мМ АМФ. Ровно через 5, 10 и 15 мин из реакционной смеси отбирают 0,2 мл пробы и определяют в них содержание неорганического фосфата по Фiske — Суббароу (Умбрейт и соавт., 1951). Для этого 0,2 мл пробы смешивают с 3,8 мл 0,0735 н. раствора H_2SO_4 . Подкисление прекращает ферментативную реакцию. Пробы быстро переносят в ледяную баню, добавляют 0,8 мл раствора молибдата аммония, тщательно перемешивают и инкубируют 5 мин при 37 °С. Необходимо, чтобы конечная концентрация кислоты была близка к 1 н. Реакционную смесь вновь охлаждают и фотометрируют в 1 см кюветах на спектрофотометре при 720 нм. В случае правильно выбранной концентрации фермента получаемые при измерении величины оптической плотности не выходят за пределы рабочего участка шкалы прибора и на графике оптическая плотность — время инкубации образуют прямую линию.

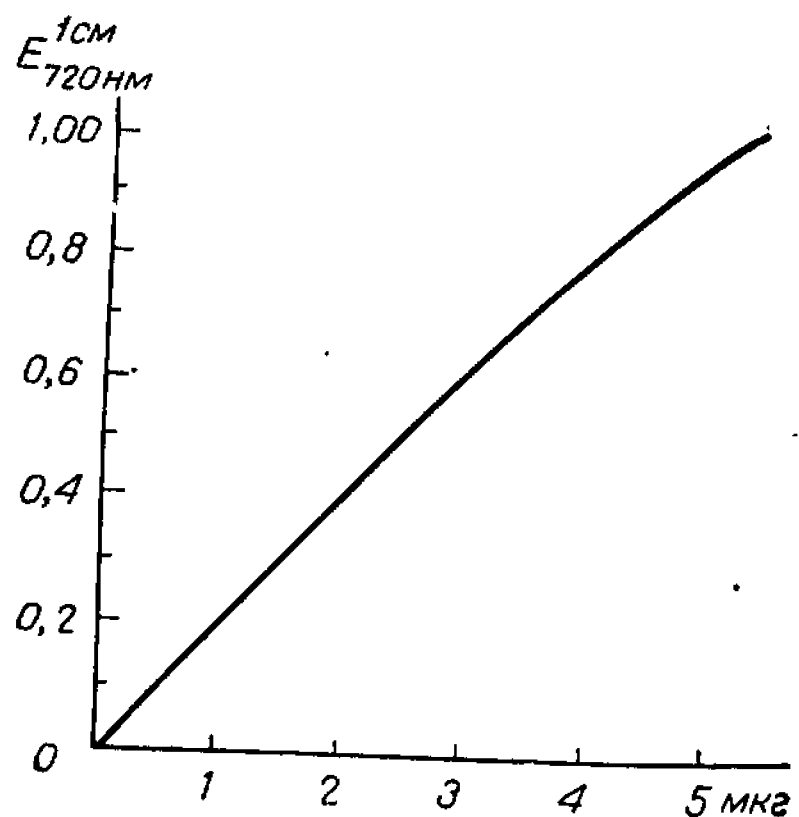
Построение калибровочного графика

При определении удельной активности препаратов гликогенфосфорилазы необходимо оценить количество глюкозо-1-фосфата, превратившегося в неорганический фосфат. Для этого заранее приготавливают раствор неорганического фосфата известной концентрации и делают его разведения. Оптическая плотность растворов окрашенного продукта окисления эйконогеном должна попадать в пределы рабочего участка шкалы измерительного прибора.

5,7 мг $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 5 мл воды. Эта навеска эквивалентна по фосфору 5,95 мг, т. е. 15 мкмоль двукалиевой соли глюкозо-1-фосфата ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{PK}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Получают раствор, по содержанию фосфора в 20 раз более разведенный, чем указанный в разделе «Реактивы» исходный 64 мМ раствор глюкозо-1-фосфата. Готовят разведения полученного раствора в 1,5, 2, 2,5, 5 и 10 раз. Из приготовленных разведений фосфата натрия отбирают пробы по 0,2 мл, смешивают с 0,6 мл воды, вновь отбирают 0,2 мл пробы и определяют в них содержание фосфора методом Фiske — Суббароу, приведенном в разделе «Ход определения». Строят калибровочный график зависимости оптической плотности E_{720} от концентрации фосфора в реакционной смеси (рис. 7).

Рис. 7. Калибровочный график для определения фосфора. При 100% расщеплении глюкозо-1-фосфата в реакционной смеси присутствует 103 мкг фосфора.

На ординате — оптическая плотность при 720 нм; на абсциссе — количество фосфора, содержащегося в пробе, в микрограммах.



Выражение активности гликогенфосфорилаз

При описанных условиях скорость реакции пропорциональна концентрации фермента в широких пределах его разведений.

$$k = \frac{1}{t} \lg \frac{X_e}{X_e - X},$$

где k — константа скорости первого порядка, имеющая размерность мин^{-1} ; X_e — количество глюкозо-1-фосфата, превращающегося в неорганический фосфат и полисахарид при достижении равновесия в процентах. За 100% принимают содержание фосфора в 0,2 мл 64 мМ глюкозо-1-фосфата (103 мкг), внесенного в инкубационную смесь, X — процент субстрата, превращенного за время t , выраженное в минутах, X_e — зависит от pH среды. В описанных условиях при pH 6,8 $X_e = 78$. При pH 6,0 $X_e = 86$. При pH 6,8 скорость реакции максимальна, при pH 6,0 она на 30% ниже.

Приведем экспериментальные данные определения удельной активности препарата фосфорилазы б из скелетных мышц кролика. За 10 мин инкубации при pH 6,0 E_{720} реакционной смеси достигла 0,790, следовательно (см. рис. 7), фермент превратил в неорганический фосфат 3,9% глюкозо-1-фосфата. Определяем

$$k = \frac{1}{10} \lg \frac{86}{86 - 3,9} = 0,1 \lg 1,05 = 0,0021 \text{ мин}^{-1}.$$

Умножив для удобства величину k на 1000, получаем общее количество единиц гликогенфосфорилазы в инкубационной смеси, $0,0021 \cdot 1000 = 2,1$ ед. Чтобы рассчитать количество единиц фермента в 1 мл раствора, взятого для анализа, результат должен быть умножен на 10. Поскольку в нашем опыте исходный раствор фермента был разведен в 400 раз, следовательно, активность гликогенфосфорилазы в исходном растворе фермента равна 8400 ед/мл. Для вычисления удельной активности фермента определяют концентрацию белка в исходном растворе одним из общепринятых методов и делят полученное число единиц в мл на концентрацию белка в мг/мл. В нашем случае концентрация белка была 7 мг/мл, следовательно, удельная активность препарата гликогенфосфорилазы $8400 : 7 = 1200$ ед/мг. Введя 30% поправку на неоптимальное значение рН 6,0, получим 1560 ед/мг вместо 1200 ед/мг. Удельная активность кристаллических фосфорилаз а и б из скелетных мышц кролика, определенная при рН 6,8, составляет соответственно 2200 и 1600 ед/мг белка (Hedrick, Fischer, 1965).

При определении активности гликогенфосфорилаз в экстрактах тканей или клеток, а также в неочищенных препаратах в метод Кори обычно вносят следующие изменения. Чтобы свести к минимуму действие фосфоглюкомутазы и фосфатаз, реакционную смесь подкисляют до рН 6,0—6,3 и дополнительно вводят в нее NaF до конечной концентрации 10 мМ, а также ЭДТА до 0,5 мМ. Реакцию прекращают, добавляя вместо минеральной кислоты охлажденную трихлоруксусную кислоту до конечной концентрации 5%. Выпавший белок отделяют центрифугированием, а в прозрачном надосадочном растворе описанным выше методом определяют неорганический фосфат.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ КИСЛОЙ α -ГЛЮКОЗИДАЗЫ (γ -АМИЛАЗЫ) ИЗ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИИ СРОДСТВА НА СЕФАДЕКСЕ

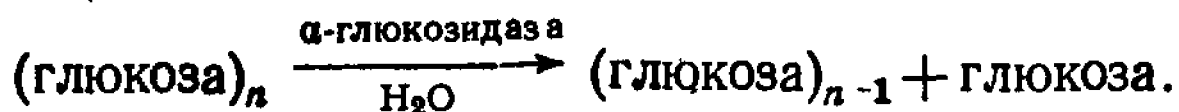
Д. М. БЕЛЕНЬКИЙ

Кислая α -глюкозидаза (γ -амилаза, КФ 3.2.1.3) катализирует гидролитическое расщепление α -1,4- и α -1,6-глюкозидных связей в мальтозе, изомальтозе, а также

родственных им полимерогомологах — гликогене, декстрани и др. Единственным низкомолекулярным продуктом, образующимся в результате действия кислой α -глюкозидазы, служит глюкоза, которая отщепляется от нередуцирующих концов молекул олиго- и полисахаридов. Кислая α -глюкозидаза, локализованная в лизосомах, является единственным ферментом, способным осуществлять в этих органеллах полное расщепление гликогена. Дефицит кислой α -глюкозидазы приводит к тяжелому наследственному заболеванию — гликогенозу II типа или болезни Помпе (Hers, 1963), характеризующемуся накоплением гликогена в клетках печени, сердца и скелетных мышц человека. Применение высокоочищенных препаратов кислой α -глюкозидазы, выделенных из тканей животных и в особенности человека, может явиться эффективным средством лечения гликогенозов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ АКТИВНОСТЕЙ КИСЛОЙ α -ГЛЮКОЗИДАЗЫ

Реакция, катализируемая α -глюкозидазой, протекает по следующему уравнению:



Определение ферментативных активностей кислой α -глюкозидазы проводят, используя в качестве субстратов, как правило, мальтозу (мальтазная активность) или гликоген (глюкоамилазная активность). Для определения активностей кислой α -глюкозидазы необходимы следующие реактивы: мальтоза, очищенная на угольно-целитовой колонке (Whistler, Durso, 1950) и не содержащая примеси глюкозы. Гликоген. 0,1 М ацетатный буфер (pH 4,8). 0,3 н. раствор NaOH. 5% раствор $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Рабочий реактив глюкозооксидазы (см. И. С. Лукомская, с. 127).

Активность кислой α -глюкозидазы определяют по скорости образования глюкозы из мальтозы и (или) гликогена при pH 4,8. 1 мл инкубационной смеси содержит 0,3 мл раствора фермента, 2 мг мальтозы или 10 мг гликогена, 100 мкмоль ацетатного буфера (pH 4,8). Время инкубации при 37 °C с мальтозой — 10—30 мин.

с гликогеном — 30—60 мин. После окончания инкубации 0,1 мл инкубационной смеси переносят в центрифужные пробирки, содержащие 1,1 мл H_2O , 0,4 мл 0,3 н. раствора $NaOH$ и 0,4 мл 5% раствора $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. После центрифугирования смеси в 1 мл центрифугата определяют количество глюкозы глюкозооксидазным методом (И. С. Лукомская, В. К. Городецкий, 1961).

За единицу мальтазной активности кислой α -глюкозидазы принимают такое количество фермента, которое катализирует расщепление 1 мкмоль мальтозы за 1 мин. Удельную активность кислой α -глюкозидазы выражают как отношение мальтазной активности в единицах к содержанию белка в миллиграммах.

ОЧИСТКА КИСЛОЙ α -ГЛЮКОЗИДАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

В основе данного метода очистки кислой α -глюкозидазы лежит способность этого фермента гидролизировать α -1,6-глюкозидную связь в полисахариде декстране (Е. Л. Розенфельд и др., 1959)*. Благодаря этому при гельфильтрации через сефадекс кислая α -глюкозидаза не элюируется согласно своей относительной молекулярной массе, а оказывается связанной с декстрановым гелем сефадекса за счет образования с последним фермент-субстратного комплекса (Вгипі е. а., 1969). После элюции всех балластных белков освобождение связанной с сефадексом кислой α -глюкозидазы осуществляют введением конкурентного ингибитора фермента — метил- α -D-глюкопиранозида, приводящего к быстрой элюции α -глюкозидазы в небольшом элюционном объеме (Д. М. Беленький, Е. Л. Розенфельд, 1971).

Гомогенизация и экстракция

Печень, полученную через 8—12 ч после смерти человека и замороженную при $-20^\circ C$, пропускают через мясорубку и гомогенизируют 5 мин в 2,5-кратном объеме охлажденного до $4^\circ C$ раствора А, содержащего 25 мМ $NaCl$, 1 мМ ЭДТА и доведенного 1 н. раствором $NaOH$ до рН 6,7. Экстракцию фермента осуществляют в течение 16—20 ч на холоду. Гомогенат центрифугируют на рефрижираторной центрифуге (ЦВР) в течение 60 мин при 28 000 g.

Осаждение сульфатом аммония

К полученному экстракту при 4 °С медленно добавляют сухой сульфат аммония (перекристаллизованный) до насыщения 0,7 [из расчета 44 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 100 мл экстракта]. Осадок, сформировавшийся на холоду в течение ночи, отделяют центрифугированием на ЦВР в течение 40 мин при 28 000 g, суспендируют в минимальном объеме охлажденного раствора А и диализуют сначала против дистиллированной воды, а затем против раствора А до полного удаления следов сульфата аммония и глюкозы. Об отсутствии в диализованном препарате фермента сульфата аммония и глюкозы судят по отрицательной реакции с реактивом Несслера и с глюкозо-оксидазным реактивом, соответственно.

Сгущение

Выпавший после диализа осадок белка удаляют центрифугированием на ЦВР в течение 60 мин при 28 000 g, а надосадочную жидкость сгущают в роторном испарителе при 20—22 °С. Сгущенный раствор фермента вновь диализуют против раствора А и отделяют от образовавшегося осадка центрифугированием. Объем сгущенного раствора фермента не должен превышать 5—6% от общего объема геля сефадекса в колонке.

Хроматография на сефадексе G-150

Сгущенный раствор фермента наносят на колонку с сефадексом G-150, предварительно уравновешенным раствором А. Необходимый размер колонки определяется количеством исходного материала.

Например, при выделении кислой α -глюкозидазы из 3 кг печени используют колонку диаметром 6,8 см и длиной 100 см с общим объемом 3,6 л.

Элюцию проводят раствором А. Скорость элюции — 20—30 мл/ч. Объем каждой коллекторной фракции — 7—10 мл. Во фракциях определяют концентрацию белка по поглощению при 280 нм и мальтазную активность. После того как белок будет полностью элюирован с сефадекса, что достигается прохождением объема, в 1,5 раза превышающего общий объем геля в колонке, на колонку наносят 50 мл 3—4% раствора метил- α -D-

Очистка кислой α -глюкозидазы из печени человека
(пример опыта)

Этапы очистки	Характеристика фракций					
	объем мл	концен- трация белка, мг/мл	мальтазная активность, ед.	удельная активность, ед/мг	степень очист- ки	выход, %
Экстракт	3530	26	1136	$1,23 \cdot 10^{-2}$	1	100
Осаждение сульфатом ам- мония до 0,7 насыщения	1540	18,5	629	$2,20 \cdot 10^{-2}$	1,74	55
Сгущение	209	136,6	487,5	$1,71 \cdot 10^{-2}$	1,38	43
Хроматография на сефадексе G-150	293	0,13	337,6	8,83	720	30

глюкопиранозида, приготовленного на растворе А. Дальнейшую элюцию осуществляют снова раствором А. Введенный ингибитор приводит к выходу кислой α -глюкозидазы из колонки в виде острого пика на элюционной кривой. Полученный таким образом раствор фермента диализуют против дистиллированной воды до полного удаления из него метил- α -D-глюкопиранозида, сгущают на роторном испарителе при 20—22 °С (ни в коем случае не перегревать!), а затем лиофилизируют из замороженного состояния. Из 3 кг печени человека получают около 40 мг очищенной кислой α -глюкозидазы.

В табл. 14 приведен результат одного из опытов по очистке кислой α -глюкозидазы из печени человека.

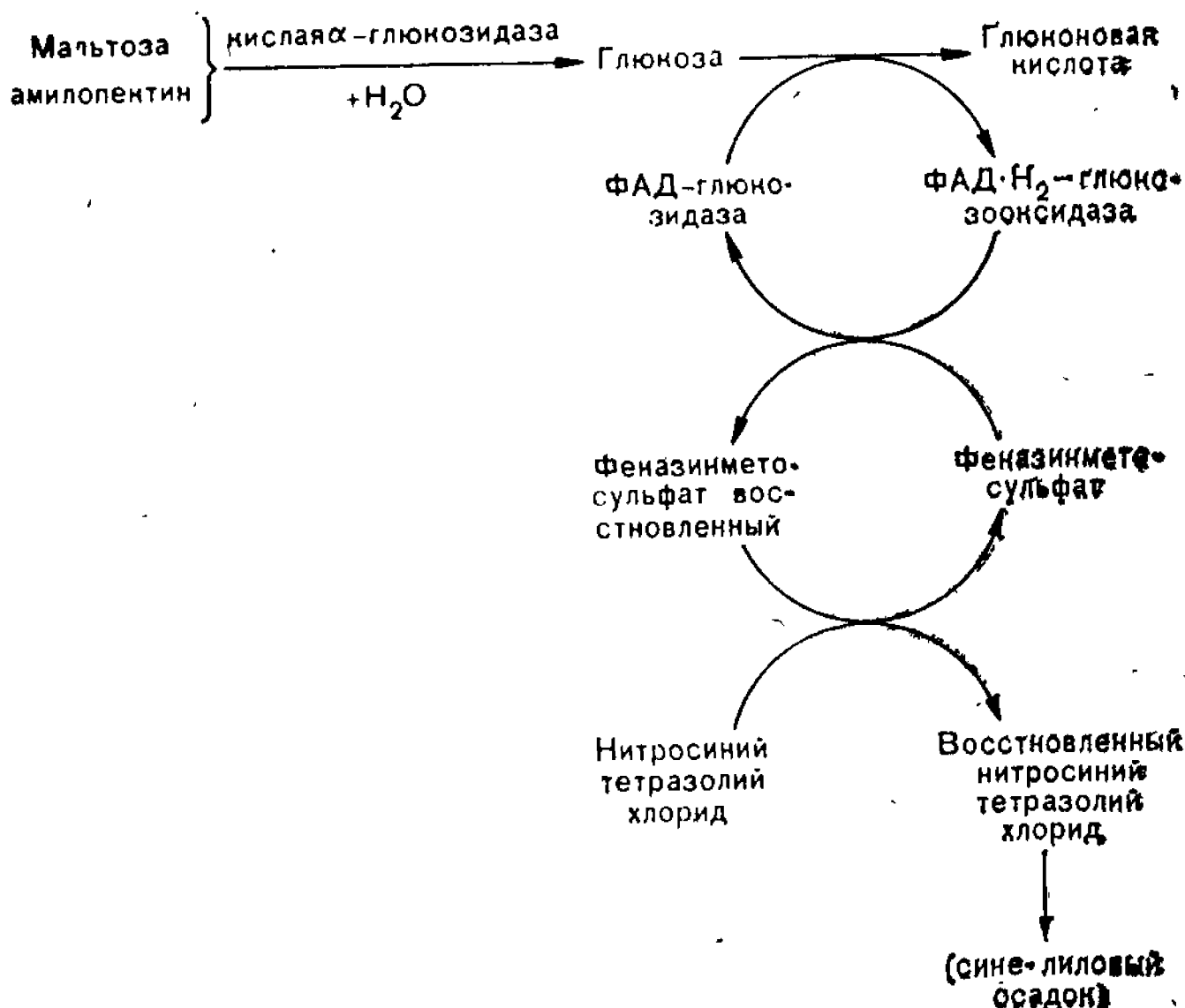
Описанный метод дает возможность сравнительно простого получения гомогенных, по данным ультрацентрифугирования и диск-электрофореза в полиакриламидном геле, препаратов кислой α -глюкозидазы с выходом около 30%. Благодаря тому что этот метод очистки кислой α -глюкозидазы основан исключительно на специфических свойствах самого фермента (способность расщеплять α -1,6-глюкозидные связи в декстрани и конкурентно тормозиться метил- α -D-глюкопиранозидом), существенным достоинством его перед другими методами является его универсальность, т. е. применимость для получения высокоочищенных препаратов фермента практически из любого биологического источника.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАЛЬТАЗНОЙ И ГЛЮКОАМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЕЙ КИСЛОЙ α -ГЛЮКОЗИДАЗЫ (γ -АМИЛАЗЫ) ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ПРЕПАРАТА ФЕРМЕНТА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Д. М. БЕЛЕНЬКИЙ

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения мальтазной и глюкоамилазной активностей кислой α -глюкозидазы (КФ 3.2.1.3) в пластине геля после электрофореза фермента в полиакриламидном геле (Д. М. Беленький, Д. Б. Цукерман, Е. Л. Розенфельд, 1975) представляет собой модификацию метода Далквиста и Брана (Dahlqvist, Brun, 1962), разработанного для гистохимического выявления дисахаридаз. Метод основан на сопряжении реакции образования глюкозы из мальтозы или амилопектина с реакцией ферментативного окисления глюкозы под действием глюкозооксидазы в присутствии протонпереносящих красителей — феназинметосульфата и нитросинего тетразолия хлорида.



Последовательность реакций, приводящих к появлению нерастворимого окрашенного продукта — восстановленного нитросинего тетразолия хлорида, представлена на схеме II:

Из схемы видно, что глюкоза, образованная под действием кислой α -глюкозидазы, окисляется специфическим ферментом, ФАД-содержащей глюкозооксидазой, до глюконовой кислоты. При этом происходит восстановление глюкозооксидазы. Восстановленная ФАД·Н₂-глюкозидаза окисляется далее сопряженно с восстановлением феназинметосульфата, который в свою очередь окисляется сопряженно с восстановлением нитросинего тетразолия. Восстановленный нитросиний тетразолий представляет собой нерастворимое окрашенное в синелиловый цвет соединение.

РЕАКТИВЫ

Мальтоза, не содержащая примеси глюкозы.

Амилопектин.

Глюкозооксидаза.

Феназинметосульфат (ФМС).

Нитросиний тетразолий хлорид (Нитро СТ), 2,2'-динитрофенил-5,5'-дифенил-3,3'-(3,3-диметокси-4,4'-дифенилен)-дитетразолий хлорид.

Агар-агар.

0,4 М фосфатный буфер (рН 6,0); 48,4 г NaH₂PO₄·H₂O и 8,8 г Na₂HPO₄·2H₂O растворяют в воде и доводят водой до 1 л.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Диск-электрофорез кислой α -глюкозидазы проводят в 7,5% полиакриламидном геле при рН 4,3 с β -аланинацетатным электродным буфером (Маурер, 1971); время электрофореза 90 мин при силе тока 4 мА на трубку. После окончания электрофореза столбики полиакриламидного геля быстро извлекают из стеклянных трубочек. Часть столбиков геля окрашивают на белок 0,2% раствором кумасси бриллиантового голубого R-250 в 7% растворе уксусной кислоты (можно использовать и другие красители, например амидочерный); другую часть столбиков геля используют для выявления ферментативных активностей кислой α -глюкозидазы методом контактных пленок. Для этого гели полиакриламида помещают в желобки гофрированной пластмассовой

подставки и покрывают их стеклянной пластинкой, на которую нанесен слой агарового геля, содержащего мальтозу (для выявления мальтазной активности) или амилопектин (для выявления глюкоамилазной активности), глюкозооксидазу, а также красители — ФМС и Нитро СТ.

Агаровый гель, содержащий все необходимые ингредиенты для выявления кислой α -глюкозидазы, готовят смешиванием растворов А и Б в отношении 3:1. Для приготовления раствора А в термостойкую пробирку помещают 160 мг агар-агара, 40 мг мальтозы или 160 мг амилопектина и 6 мл 0,4 М фосфатного буфера (рН 6,0). Смесь кипятят на водяной бане в течение 20—30 мин до образования гомогенного раствора. Раствор Б готовят из глюкозооксидазы, ФМС и Нитро СТ, растворяя их в 0,4 М фосфатном буфере (рН 6,0). 2 мл раствора Б содержит 1,6 мг глюкозооксидазы, 1,2 мг ФМС и 3,2 мг Нитро СТ. После охлаждения раствора А до 55—60 °С к нему добавляют раствор Б и образовавшуюся смесь быстро наносят на горизонтально установленную стеклянную пластинку (при размере пластинки 6×9 см требуется около 8 мл смеси растворов А и Б). Для лучшего затвердевания агарового геля пластинки с нанесенным слоем выдерживают 10—15 мин при 4 °С. Так как красители обладают способностью к фотоокислению, раствор Б и готовые пластинки не должны подвергаться длительному воздействию света.

Инкубацию полиакриламидных гелей, содержащих α -глюкозидазу, с пластинкой агарового геля, содержащего субстраты α -глюкозидазы, проводят во влажной камере при 37 °С. Появление на лимонно-желтом фоне агарового геля сине-лиловой полосы нерастворимого восстановленного Нитро СТ указывает на наличие в полиакриламидном геле α -глюкозидазной активности. Длительность развития окраски связана с концентрацией кислой α -глюкозидазы в образце, подвергнутом электрофорезу. Например, при электрофорезе высокоочищенного препарата α -глюкозидазы (см.: Д. М. Бельский, с. 104) фермент проявляется через 15—30 мин инкубации: при незначительной концентрации фермента, например в гомогенате, время проявления активности составляет несколько часов. Во избежание размывания окрашенной зоны вследствие диффузии реакцию останавливают опрыскиванием пластинки 10% раствором три-

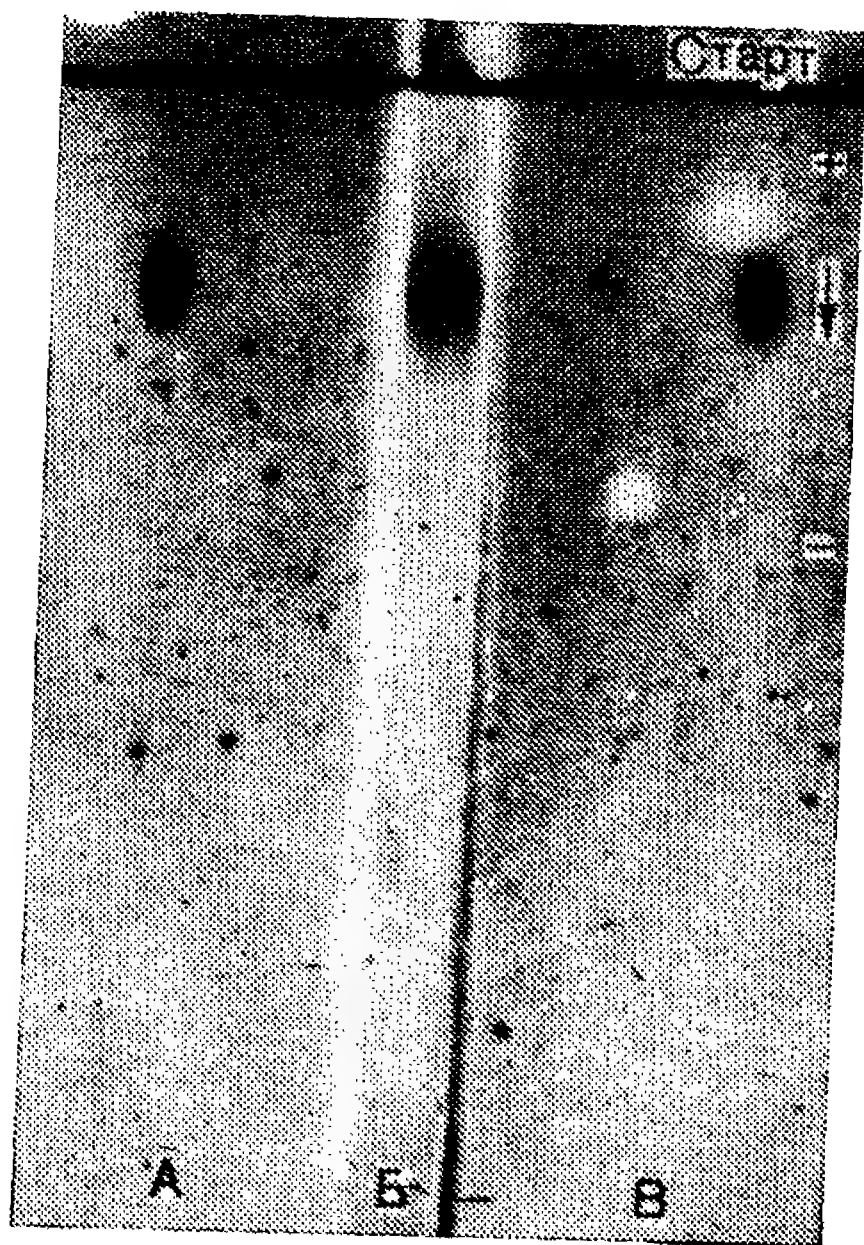


Рис. 8. Диск-электрофорез кислой α -глюкозидазы.

Б — гель окрашен на белок кумасси бриллиантовым голубым R-250. А — мальтазная и В — глюкоамилазная активность кислой α -глюкозидазы (выявление описано в тексте).

хлоруксусной кислоты. Проявленные пластинки фотографируют либо сразу после появления окрашенных зон, либо после предварительного высушивания пластинок в термостате при 37 °C.

Необходимо отметить, что для выявления указанным методом глюкоамилазной активности α -глюкозидазы нельзя заменить амилопектин гликогеном. Последний из-за очень большой относительной молекулярной массы не может диффундировать из агарового геля в полиакриламидный гель и, следовательно, не подвергается действию фермента.

На рис. 8 приведена фотография пластинки агарового геля, на которой выявлены как мальтазная (А), так и глюкоамилазная (В) активности гомогенного препарата кислой α -глюкозидазы из печени человека. В середине пластинки (Б) помещен столбик полиакриламидного геля, окрашенный 0,2% раствором кумасси бриллиантового голубого R-250 на белок.

Описанный метод определения ферментативных активностей кислой α -глюкозидазы после электрофореза

препарата фермента может быть применен как для доказательства гомогенности выделяемой α -глюкозидазы, так и для анализа изоферментного состава кислой α -глюкозидазы в различных тканях и органах человека и животных.

Настоящий метод может быть, по-видимому, использован для выявления ферментативной активности любого глюкозообразующего фермента, как, например, β -глюкозидазы, фосфатаз глюкозо-1-фосфата и глюкозо-6-фосфата.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ 6-ДЕЗОКСИГЕКСОЗ

Г. Я. ВИДЕРШАЙН, Л. Г. КОЛИБАБА

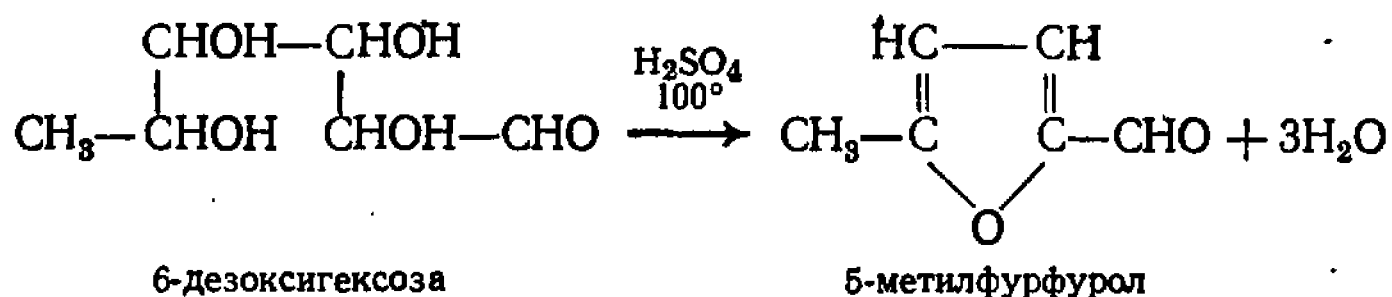
6-Дезоксисахара широко распространены в составе различных природных соединений, в связи с чем представляет интерес выяснение их роли в специфичности и биологической активности этих соединений. Так установлено, что антигенная специфичность ряда групповых веществ крови определяется L-фукозой. Отщепление от этих высокомолекулярных соединений только фукозильных остатков совершенно изменяет специфичность групповых веществ (Г. Я. Видершайн, 1968).

Выяснение путей, по которым происходит обмен 6-дезоксисахаров, представляет не только теоретический интерес, но и имеет большое практическое значение для понимания механизмов некоторых наследственных заболеваний человека, например фукозидоза, характеризующегося накоплением в тканях фукозосодержащих гликопротеидов и гликолипидов (Van Hoof, Hers, 1968).

Для изучения ферментативных превращений 6-дезоксисахаров и оценки их роли в различных соединениях требуются достаточно надежные методы их определения. До недавнего времени основным методом определения 6-дезоксигексоз был метод, предложенный Дише, Шетлес (Dische, Shettles, 1948), который позволяет определять общее содержание свободных и связанных (в составе других соединений) 6-дезоксигексоз. В последние годы в литературе появилось описание нескольких новых методов определения содержания только свободных 6-дезоксигексоз.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ 6-ДЕЗОКСИГЕКСОЗ (Dische, Shettles, 1948)

Принцип метода. Под действием серной кислоты при кипячении от 6-дезоксигексоз отщепляется вода и образуется 5-метилфурфурол.



5-Метилфурфурол, соединяясь с гидрохлоридом цистеина, дает хромоген с максимумом поглощения при 396 нм.

Реактивы. Смесь H_2SO_4 и H_2O (6 объемов концентрированной H_2SO_4 и 1 объем H_2O).

Цистеиновый реактив — 3 г гидрохлорида цистеина в 100 мл воды.

Ход определения. К исследуемым пробам (объем 1 мл), охлажденным в бане со льдом, приливают по 4,5 мл смеси серной кислоты с водой. Пробы тщательно перемешивают на холоду и прогревают в кипящей водяной бане в течение 3 мин. Затем пробы охлаждают и к каждой добавляют при перемешивании по 0,1 мл цистеинового реактива. Для определения неспецифического поглощения цистеинового реактива вводят контроль, т. е. пробу, в которой отсутствует фукоза, но содержатся все остальные компоненты реакции. Через $1\frac{1}{2}$ —2 ч после прибавления цистеинового реактива пробы фотометрируют на СФ-4А при 396 и 430 нм. Измерение проводят против контрольной пробы. Разница в оптической плотности при 396 и 430 нм (см. «Специфичность метода») отражает количество фукозы в пробах.

Количество 6-дезоксигексоз в исследуемых образцах рассчитывают по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Готовят стандартный раствор, содержащий 50 мкг фукозы или рамнозы в 1 мл воды. Разливают в пробирки по 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 и 0,6 мл стандартного раствора, что соответствует содержанию в них 6, 10, 15, 20 и 30 мкг 6-дезоксигексозы. Доводят каждую пробу до 1 мл водой, проводят реакцию, как описано выше, и строят кривую зави-

симости поглощения при 396 нм (длина хода луча в кювете 1 см) от количества 6-дезоксигексозы (мкг).

Специфичность метода. Использование сильной серной кислоты (86% по объему) позволяет определять количество метилпентоз в составе различных углеводсодержащих соединений без их предварительного гидролиза. Однако если в исследуемой пробе присутствуют полисахариды, гликолипиды и гликопротеиды, то в смеси появляются самые различные сахара: пентозы, гексозамины и гексуроновые кислоты, которые, так же как и 6-дезоксигексозы, могут образовывать фурфуролы и при добавлении цистеина давать окрашенные продукты. Таким образом, основная трудность метода заключается в определении специфического поглощения 6-дезоксигексоз в присутствии других сахаров. Гексозы под действием серной кислоты образуют 5-оксиметилфурфурол, который при конденсации с гидрохлоридом цистеина дает хромоген с максимумом поглощения при 415 нм. Абсорбционная кривая гексоз симметрична и поглощение при 396 и 430 нм равны. Для 6-дезоксигексоз максимум поглощения находится при 396 нм, а при 430 нм поглощение равно 0. Поэтому для их количественного определения в присутствии гексоз используют разницу в поглощении при 396 и 430 нм. Влияние гексоз можно также в значительной мере исключить более длительным нагреванием проб перед добавлением L-цистеина, в течение 10 мин вместо 3, что приводит к значительному уменьшению поглощения гексоз. Величина поглощения 6-дезоксигексоз при этом почти не изменяется.

К достоинствам метода Дише и Шетлес относятся его высокая специфичность (табл. 15) и чувствительность. Разность между оптическими плотностями $D_{396} - D_{430}$ является линейной функцией концентрации 6-дезоксигексоз (фукозы или рамнозы) в пределах от 1 до 50 мкг. Метод хорошо воспроизводим и при определении общего содержания 6-дезоксигексоз в составе сложных углеводсодержащих соединений не требуется их предварительного гидролиза. При этом количество 6-дезоксисахаров (фукозы) прямо пропорционально количеству гликопротеидов (табл. 15, опыт 6).

Некоторые трудности, возникающие при определении 6-дезоксигексоз в биологических жидкостях и тканях, были рассмотрены ранее (Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, 1971).

**Специфичность метода определения свободных и связанных
6-дезоксигексоз (Dische, Shettles, 1948)**

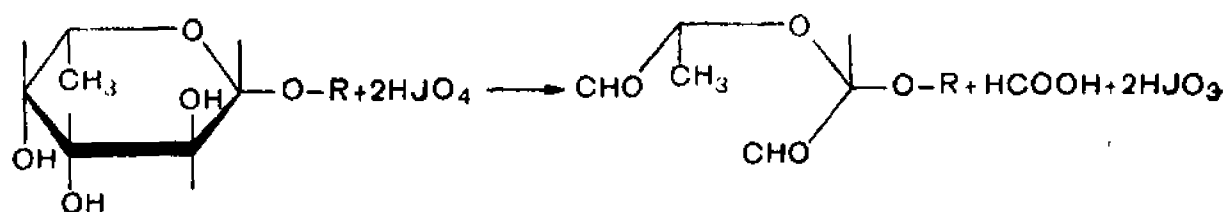
№ опыта	Вещество	Концентрация (г/л)	D _{430nm}	D _{396nm}	D _{396nm} — D _{430nm}
1	Фукоза	0,01	0,007	0,222	+0,215
	Галактоза	0,025	0,074	0,074	0,000
	Глюкоза	0,025	0,117	0,118	+0,001
	Гликоген	0,05	0,291	0,293	+0,002
2	Фукоза	0,01	0,056	0,299	+0,243
	Фукоза + РНК	0,01 + 0,1	0,052	0,296	+0,244
	Гиалуроновая кислота	0,25	0,026	0,031	+0,005
	Хондроитинсерная кислота	0,30	0,001	0,013	+0,012
	ДНК	0,20	0,046	0,045	-0,001
3	Фукоза	0,01	0,008	0,231	+0,223
	Фукоза + галактоза + ацетилглюкозамин	0,01 + 0,04 + + 0,05	0,145	0,362	+0,217
	Рамноза	0,01	0,007	0,212	+0,205
4	Адениловая кислота из дрожжей	0,10	0,019	0,028	+0,009
	Манноза	0,05	0,127	0,126	-0,001
	Фруктоза	0,05	0,205	0,201	-0,004
	Глюкуроновая кислота	0,10	0,016	0,017	+0,001
	Галактуроновая кислота	0,20	0,044	0,052	+0,008
5	Фукоза	0,01	0,008	0,233	+0,225
	Фукоза + арабиноза	0,01 + 0,08	0,028	0,260	+0,232
	Фукоза + сывороточный альбумин	0,005 + 1,00	0,032	0,140	+0,108
6	Группоспецифическое вещество крови А	0,10	0,098	0,255	+0,157
	То же	0,20	0,211	0,530	+0,317
	Гидролизат группоспецифического вещества крови А	0,10	0,095	0,220	+0,125

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ 6-ДЕЗОКСИГЕКСОЗ

Общий принцип. Методы основаны на особенности поведения 6-дезоксигексоз при периодатном окислении. Сущность периодатного окисления заключается в том, что под действием йодной кислоты разрываются —С—С-связи между каждой парой соседних углеродных атомов, при которых находятся свободные гидроксильные группы.

При этом из каждой СНОН-группы образуется муравьиная кислота, а из СН₂ОН-группы (гексозы) и СНОН—СН₃-группы (6-дезоксигексозы) — формальдегид и ацетальдегид* соответственно.

Таким образом, количественное определение 6-дезоксигексоз в присутствии других сахаров (в частности, гексоз) сводится по существу к определению ацетальдегида в присутствии формальдегида. Очевидно также, что при действии йодной кислоты выделение ацетальдегида (формальдегида) будет происходить только при наличии в смеси свободных 6-дезоксигексоз (гексоз). 6-Дезоксигексозы, образующие глюкозидную связь и входящие в состав других соединений, не будут образовывать ацетальдегид при периодатном окислении:



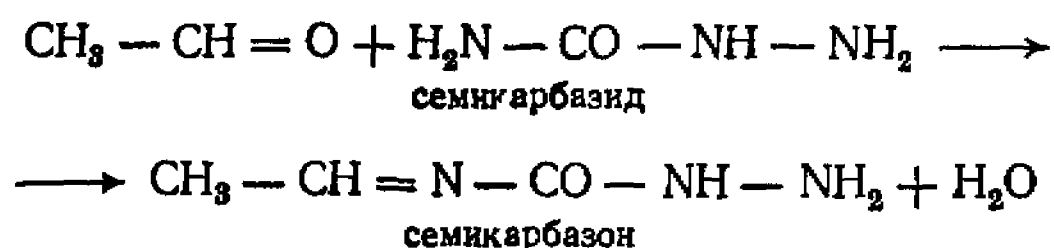
В настоящее время существует три химических метода определения свободных 6-дезоксисахаров, отличающиеся тем реагентом, который связывает ацетальдегид (Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, 1971).

Ниже рассмотрен метод определения свободных 6-дезоксигексоз (Bhattacharya, Aminoff, 1966), слегка модифицированный нами (Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, 1971).

Этот метод является наиболее удобным для применения в лабораторных условиях.

* Формальдегид и ацетальдегид образуются также при периодатном окислении серина и треонина.

Основным реактивом в этом методе служит гидрохлорид семикарбазида, который реагирует с ацетальдегидом, выделяющимся при периодатном окислении, по следующей реакции:



Образующийся семикарбазон имеет максимум поглощения при 224 нм.

Реактивы. 6,7 мМ раствор гидрохлорида семикарбазида в растворе 0,06 М NaH_2PO_4 и 0,14 М Na_2HPO_4 (рН 7,0).

Иодный реактив, приготовляемый из 3 компонентов: раствор 0,2 М HIO_4 , свежеприготовленный (1 объем); 0,2 М раствор NaOH (1,5 объема); 0,2 М раствор глицина (1,2 объема).

Иодный реактив готовится непосредственно перед использованием путем смешивания 3 растворов в указанных пропорциях; рН смеси должен быть 7,3—7,5. Реактивом можно пользоваться в течение 2—2½ ч, затем в нем образуется осадок.

Стандартный раствор фукозы или рамнозы (100 мкг/мл)

Ход определения. Определение проводят в чашках Конвея. Анализируемые пробы объемом 0,5 мл вносят в реакционную наружную камеру чашек Конвея. Кроме того, для построения калибровочного графика в наружную камеру других чашек Конвея помещают по 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 и 0,3 мл стандартного раствора, что соответствует 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мкг фукозы и каждую пробу доводят водой до 0,5 мл. В центральную камеру чашек наливают 1,5 мл раствора семикарбазида. В реакционную камеру быстро прибавляют 2 мл йодного реактива. Предварительно смазанные специально приготовленной смазкой чашки моментально закрывают стеклами. Содержимое камер осторожно перемешивают. Одновременно готовят контрольную пробу с водой вместо фукозы. Чашки выдерживают при комнатной температуре в течение 2 ч.

После этого образовавшийся раствор семикарбазона из центральной камеры чашек переносят в пробирки; по-

лученные пробы фотометрируют на СФ-4А при 224 нм. При серийных определениях в качестве стандарта используют не весь ряд разведений стандартного раствора, а лишь 2—3 пробы с известным содержанием фукозы.

Метод специфичен (табл. 16) и может применяться для количественного определения 6-дезоксигексоз в при-

Таблица 16

Специфичность метода определения свободных 6-дезоксигексоз (L-фукозы) в присутствии других веществ (Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, 1971)

Добавленное вещество	%	Добавленное вещество	%
D-манноза	103,7	D-глюкозамин·HCl	94,2
D-глюкоза	104	D-галактоза + N-ацетил-D-глюкозамин + N-ацетилнейраминовая кислота + п-нитро-фенил-α-L-фукопиранозид	100
D-глюкозо-1-фосфат	90	Аланин	108
D-рибоза	103,7	Валин	108
2-дезоксид-рибоза	101,8	Глутаминовая кислота	105
N-ацетилнейраминовая кислота	99,5	Метионин	102
D-глюкозамин·HCl	109,7	Триптофан	108,8
D-галактоза	102,4	Треонин (0,12 мкмоль)	200
N-ацетил-D-глюкозамин	78,4		
То же (0,2 мкмоль)	89		
» (0,1 мкмоль)	95,3		

Примечание. Количество фукозы в пробе — 0,12 мкмоль, количество каждого добавленного вещества — 0,6 мкмоль, за исключением тех случаев, где количество указано в скобках.

$E_{224}^{1\text{ см}}$ смеси при периодатном окислении выражено в процентах по отношению к $E_{224}^{1\text{ см}}$ раствора L-фукозы.

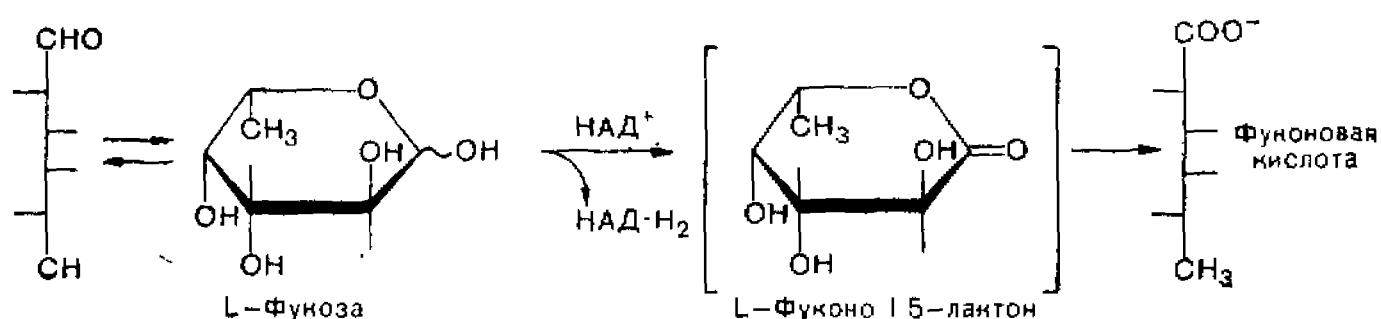
сутствии других сахаров (Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, 1971).

Необходимо, однако, отметить, что при наличии в атмосфере ацетона, циклогексанона и некоторых других соединений, взаимодействующих с семикарбазидом, точность метода значительно снижается.

Ферментативные методы определения 6-дезоксигексоз

В настоящее время в этом направлении получены первые, но очень обнадеживающие результаты. Предложен ферментативный метод определения содержания свободной L-фукозы с помощью специфической L-фуко-

зодегидрогеназы, катализирующей следующую реакцию (Finch e. a., 1969)*:



По количеству восстановленного $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ ($\lambda_{\text{макс}} = 340 \text{ нм}$) можно судить о количестве свободной L-фукозы. Интересно отметить узкую субстратную специфичность фермента — он не окисляет ни D-фукозу, ни L-рамнозу.

Таким образом, с помощью ферментативных методов можно будет уже, вероятно, в самом ближайшем будущем количественно определять различные 6-дезоксисахара — L-фукозу, L-рамнозу и др. Понятие «специфичность», которое до сих пор характеризовало возможность суммарного определения 6-дезоксигексоз в присутствии других сахаров, должно получить с развитием ферментативных методов более точный смысл и характеризовать возможность специфического определения индивидуальных 6-дезоксигексоз.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОСАХАРОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

В. К. ГОРОДЕЦКИЙ, В. И. МИХАЙЛОВ

Специфическое определение кетосахаров в присутствии избытка альдосахаров приобретает все большее значение как в лабораторных, так и в клинических исследованиях. Определение содержания фруктозы и сахарозы в крови и моче больных при постановке диагноза и контроле за ходом лечения мелитурий различного происхождения (фруктозурии, сахарозурии и др.), динамика изменения содержания этих сахаров в биологических жидкостях при проведении соответствующих нагрузок больным, количественная оценка кетосахаров в моче при определении скорости клубочковой фильтрации почек с помощью инулина — вот далеко не полный перечень клинического использования методов определения кетосахаров.

ПРИНЦИП МЕТОДОВ

В клинической и исследовательской практике у нас пока не получил широкого применения какой-либо достаточно надежный, чувствительный, специфичный и простой метод прямого определения кетосахаров. Необходимым требованиям могут отвечать методы, основанные на образовании фурфуролов. Известно, что кетосахара при нагревании в кислой среде образуют фурфуролы и оксиметилфурфуролы в 100 раз быстрее, чем альдосахара. Подбирая концентрацию кислоты и температурный режим реакции, можно добиться количественного перевода кетоз в фурфуролы при полном сохранении альдосахаров. Количество образовавшихся фурфуролов определяют колориметрически по образованию окрашенных продуктов их конденсации с ароматическими соединениями: антроном (Van Handel, 1968), β -индолилуксусной кислотой (В. К. Городецкий, Е. И. Щорс, 1969; Neugovskiy, 1956), тиобарбитуровой кислотой (Percheron, 1962) и др.

Наряду с определением суммы кетосахаров в пробе можно определить содержание редуцирующих и нередуцирующих кетосахаров. Для этого достаточно пробу подвергнуть щелочной обработке при нагревании; при этом происходит щелочная деградация всех редуцирующих сахаров до органических кислот, а в пробе остаются нередуцирующие сахара (сахароза, раффиноза и др.). По разнице между суммарным содержанием кетосахаров и содержанием нередуцирующих кетоз можно определить количество редуцирующих кетосахаров.

Для точного определения количества присутствующей в пробе сахарозы часть проб необходимо подвергнуть воздействию дрожжевой инвертазы, которая специфично гидролизует сахарозу на глюкозу и фруктозу, а затем обработать как инкубированные с инвертазой, так и неинкубированные пробы щелочью. Разница показателей кетосахаров в пробах после щелочной обработки до и после инкубации с инвертазой будет соответствовать количеству сахарозы в пробе.

Для индивидуального определения всех кетосахаров в исследуемой пробе и для подтверждения данных, полученных при определении в пробирках, можно использовать методы качественной и количественной хроматографии на бумаге (В. К. Городецкий, 1968) или элект-

рофореза на бумаге. Проба биологической жидкости, подготовленная для хроматографического и особенно для электрофоретического анализа, должна быть тщательно очищена от белка, пигментов и солей. При определении на бумаге сахаров, разделенных одним из указанных выше методов, применяют специфичные для кетосахаров проявители (резорциновый, димедоновый и др.).

Ниже описан метод определения кетосахаров по тиобарбитуровой кислоте, а также методы хроматографии и электрофореза.

РЕАКТИВЫ

0,02 М водный раствор тиобарбитуровой кислоты (навеску кислоты растворяют в воде при нагревании); раствор стабилен несколько дней.

Концентрированная HCl (соляная кислота).

2 н. раствор NaOH.

Активированный животный уголь «Карболен» (таблетки угля необходимо размолоть и отсеять от пыли).

Ионообменная смола Амберлит IR-120 [H⁺] или Дауэкс D-50[H⁺].

Ионообменная смола Амберлит IRA-410 [HCO₃⁻] или Дауэкс D-1 [HCO₃⁻].

Водный раствор дрожжевой инвертазы (50—100 мкг фермента в 0,1 мл воды). Инвертазу (β-фруктозидазу) получали из пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* адсорбцией на Ca₃(PO₄)₂; после элюции инвертазу пересаждали и лиофилизировали. 50 мкг лиофилизированного препарата полностью расщепляли до 100 мкг сахарозы за 30 мин инкубации при 30 °C.

Растворитель для хроматограмм — ацетон : н. бутанол : вода (7 : 2 : 1).

Проявители для кетосахаров:

1) резорциновый (500 мг резорцина, 15 г трихлоруксусной кислоты и 0,25 мл 0,1 М CuSO₄ растворяют в 100 мл. н. бутанола);

2) димедоновый (300 мг димедона и 10 мл о-фосфорной кислоты, d=1,74, растворяют в 90 мл 96% этанола).

0,05 М боратный буфер (рН 8,5—9,0) для горизонтального электрофореза сахаров на бумаге.

20% водный раствор этанола.

0,3 н. раствор ZnSO_4 .

0,3 н. раствор $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

Сахара-свидетели для хроматографии (фруктоза и глюкоза по 400 мкг, сахароза 800 мкг в 10 мкл 50% этанола) наносят в пятно по 5 мкл.

Стандартный раствор сахарозы, 0,3 мкмоль в 1 мл воды или насыщенного водного раствора бензойной кислоты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОСАХАРОВ ПО ТИОБАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЕ

Перед определением кетосахаров в моче пробу подвергают депигментации. Для этого к 2 мл свежей или консервированной хлороформом и сохранявшейся на холоду мочи добавляют 200 мг активированного угля «Карболен» и встряхивают пробу в течение 10 мин. Затем пробу центрифугируют 10 мин при 1000 g. Если надосадочная жидкость остается окрашенной, то депигментацию повторяют с новой порцией угля.

Бесцветную пробу мочи обессоливают ионообменными смолами в объеме. К слитой в центрифужную пробирку надосадочной жидкости добавляют по 0,6 мл суспензии катионообменной смолы Дауэкс D-50 $[\text{H}^+]$ и анионообменной смолы Дауэкс D-1 $[\text{HCO}_3^-]$, смесь встряхивают 5—10 мин. Прекращение образования пузырьков CO_2 свидетельствует об окончании работы смол. Если при добавлении к смеси незначительного количества свежей смолы углекислый газ больше не образуется, это указывает на завершение обессоливания. Затем пробу центрифугируют 5 мин при 1000 g и надосадочную жидкость используют для определения сахаров.

При работе с кровью из пробы прежде всего удаляют белки. Наиболее надежным способом депротеинизации является осаждение белков сульфатом цинка и щелочью. К 0,1 мл капиллярной или венозной гепаринизированной крови приливают по 0,4 мл 0,3 н. растворов ZnSO_4 и $\text{Ba}(\text{OH})_2$. При перемешивании образуется интенсивный осадок, пробу центрифугируют 10—15 мин при 1000 g. Центрифугат сливают в пробирку, а осадок промывают при перемешивании еще 1 мл воды. После центрифугирования обе надосадочные жидкости объединяют и выпаривают досуха в роторном испарителе при

37 °С. Выпаренный осадок растворяют в 1 мл дистиллированной воды и обессоливают смолами, как указано выше. Содержание кетосахаров в крови или спинномозговой жидкости обычно бывает в 10 или в 100 раз меньше, чем в моче, поэтому для определения необходимо увеличить соответственно объем исследуемой пробы крови или спинномозговой жидкости. Обрабатывать активированным углем пробу крови, спинномозговой жидкости или экстракта тканей нет надобности.

Из обессоленного, депигментированного и безбелкового центрифугата исследуемой жидкости отбирают три пробы по 0,1 мл (пробы А, Б, В). В пробу А доливают 0,1 мл раствора инвертазы и 0,6 мл воды (конечная концентрация инвертазы в пробе около 50 мкг/мл) и инкубируют 30 мин при 37 °С. За время инкубации в пробе А сахароза должна полностью гидролизироваться до глюкозы и фруктозы. В пробу Б доливают 0,7 мл воды, а в пробу В — 0,9 мл. После инкубации с инвертазой в пробы А и Б доливают по 0,2 мл 2 н. раствора NaOH и выдерживают 15 мин в кипящей водяной бане. Эта обработка уничтожает все редуцирующие сахара в пробе, превращая их в органические кислоты.

Конечный объем каждой из трех проб составляет 1 мл. К каждой пробе добавляют по 1 мл 0,02 М тиобарбитуровой кислоты и по 1 мл концентрированной соляной кислоты. Пробы перемешивают, закрывают стеклянными пробками в форме «слезок» или шариков и выдерживают 6 мин в кипящей водяной бане. Одновременно с опытными пробами обрабатывают контрольную пробу (1 мл воды, 1 мл тиобарбитуровой кислоты и 1 мл HCl) и пробы стандартных растворов сахарозы, содержащие 0,030, 0,075 и 0,150 мкмоль сахарозы (0,10, 0,25 и 0,50 мл исходного стандартного раствора сахарозы и 0,90, 0,75 и 0,50 мл воды соответственно), к ним добавляют по 1 мл тиобарбитуровой кислоты и по 1 мл HCl. В течение 1—2 ч после кипячения в пробах развивается желтая окраска; пробы фотометрируют на СФ-4 при 432,5 нм против контрольной пробы.

Содержание кетосахаров в пробах определяют по стандартной кривой (количество мкг сахарозы и фруктозы рассчитывают, исходя из относительной молекулярной массы сахарозы 342 и фруктозы 180). С помощью описанной обработки пробы биологической жидкости не удастся полностью освободить от различных

примесей неуглеводной природы, которые при определении дают некоторый фон окраски. Применять более жесткие способы очистки нежелательно, так как это может привести к модификации или потере сахаров и к усложнению методики. Нельзя исследовать пробу с высоким содержанием сахаров (свыше 0,5 мг в 0,1 мл), так как при щелочной обработке такая проба окрашивается в коричневый цвет. Поэтому объем исследуемой пробы необходимо регулировать в зависимости от концентрации в ней сахаров.

Расчет количества кетосахаров в пробе проводят следующим образом. Показатель пробы А будет соответствовать фону окраски, пробы Б — количеству нередуцирующих кетосахаров и фону, пробы В — сумме кетосахаров и фону. Разница Б—А будет отвечать содержанию сахарозы в пробе, разница В—Б — количеству редуцирующих кетосахаров (фруктозы главным образом) и В—А — количеству всех кетосахаров.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОСАХАРОВ МЕТОДАМИ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА БУМАГЕ

В ряде случаев наряду с фруктозой и сахарозой в моче и других биологических жидкостях могут присутствовать иные кетозы. Определить содержание этих моно- или олигосахаридов возможно с помощью хроматографии или электрофореза. Подготовку и очистку пробы проводят описанным выше методом. Перед нанесением на бумагу пробу обычно высушивают в роторном испарителе (так как объем ее бывает слишком большим для нанесения), затем растворяют в 0,1 мл воды и наносят на хроматографическую бумагу Ватман № 1. Проба должна содержать 50—200 мкг кетосахаров. Обычно сахара разделяют методом нисходящей одномерной хроматографии в системе растворителя ацетон : н. бутанол : вода (7 : 2 : 1). Время хроматографирования при комнатной температуре составляет 30—35 ч. Высушенную хроматограмму проявляют резорцином (равномерно опрысканную хроматограмму 5 мин прогревают при 160°C) или димедоном (после опрыскивания хроматограмму высушивают при комнатной температуре, а затем 5 мин прогревают при 110°C). При проведении ко-

личественной хроматографии хроматографическую бумагу предварительно промывают 20% этанолом. Участки бумаги, соответствующие тому или иному кетосахару на хроматограмме, элюируют дистиллированной водой (из расчета 1 мл на 3 см² бумаги). В элюатах определяют кетосахара по тиобарбитуровой кислоте.

Более быстрым и чувствительным методом определения кетосахаров является электрофорез на бумаге. Отрицательно заряженные комплексы фруктозы и сахарозы с анионом бората удовлетворительно разделяются на бумаге Ватман № 1 или Филтрак с помощью низковольтного горизонтального электрофореза при градиенте напряжения около 10 В/см и продолжительности 90—120 мин. Для нанесения достаточно 20—50 мкг кетосахаров. Электрофореграммы проявляют димедоном. К сожалению, электрофорез на бумаге служит скорее качественным, чем количественным, методом.

ОЦЕНКА МЕТОДА

Описанные методы определения кетосахаров довольно чувствительны, так с помощью тиобарбитуровой кислоты можно определить 5 мкг кетозы в пробе, хроматографически и электрофоретически обнаруживается 20—15 мкг кетоз (при проявлении димедоном) или 50—40 мкг (при проявлении резорцином). При определении кетоз по тиобарбитуровой кислоте образуется стойкая желтая окраска, которую можно колориметрировать в течение 1—2 ч и более после ее образования. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию кетоз к пробе до 50 мкг, далее линейная зависимость нарушается. Метод обладает высокой специфичностью и позволяет определять менее 1% альдосахаров. Тиобарбитуровый метод показывает хорошую воспроизводимость при повторных определениях и дает возможность удовлетворительно обнаруживать добавленную к моче кетозу.

У здорового человека в моче обнаруживается около 0,2—0,5 г/л сахарозы и до 0,05—0,1 г/л фруктозы. Выше 1 г/л сахарозы мы не обнаруживали в моче здоровых людей даже при нагрузках. При фруктозурии и сахарозурии содержание этих сахаров в моче может увеличиваться на несколько порядков.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДИСАХАРИДАЗ В СЛИЗИСТОЙ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

И. С. ЛУКОМСКАЯ

Дисахаридазы слизистой тонкого кишечника человека осуществляют расщепление дисахаридов, поступающих с пищей (мальтоза, сахароза, лактоза, трегалоза и др.), а также дисахаридов и олигосахаридов с α -1,4- и α -1,6-связями, образующихся при гидролитическом распаде полисахаридов (гликогена и крахмала) под действием панкреатической α -амилазы.

В результате действия дисахаридаз дисахариды распадаются на моносахариды, которые всасываются через слизистую кишечника и поступают в кровь. Мальтоза, изомальтоза и трегалоза распадаются на две молекулы глюкозы, сахароза — на глюкозу и фруктозу и лактоза — на глюкозу и галактозу.

Дисахаридазы слизистой кишечника локализованы в микроворсинках цилиндрического эпителия, которые образуют щеточную кайму, обращенную в просвет кишечника. Активность дисахаридаз в содержимом кишечника в отличие от слизистой крайне незначительна и не имеет существенного значения в общем процессе расщепления ди- и олигосахаридов.

В слизистой кишечника человека содержится несколько дисахаридаз (Dahlqvist, 1970): изомальтаза (мальтаза Ia), КФ 3.2.1.10, КФ 3.2.1.20*, катализирующая расщепление α -1,6-связи в изомальтозе и разветвленных олигосахаридах и обладающая также мальтазной активностью: инвертаза (мальтаза Ib), КФ 3.2.1.48, расщепляющая сахарозу и мальтозу; мальтазы II и III, КФ 3.2.1.20, расщепляющие мальтозу, олиго- и полисахариды; специфический фермент трегалаза, КФ 3.2.1.28, гидролизующий дисахарид трегалозу; лактаза, КФ 3.2.1.23, расщепляющая лактозу (табл. 17).

Ряд заболеваний человека, получивших название непереносимости дисахаридов, вызваны отсутствием или снижением активности одной или нескольких дисахаридаз в слизистой кишечника. Лечение этих заболеваний

* Ферменту изомальтаза (мальтаза Ia) дано два шифра, так как он расщепляет как олигосахариды с α -1,6-связями (КФ 3.2.1.10), так и олигосахариды с α -1,4-связями (КФ 3.2.1.20).

Таблица 17

**Специфичность дисахаридаз слизистой кишечника
человека (Dahlqvist, 1970)**

Фермент	Субстрат	% от общей активности субстрата
Изомальтаза (мальтаза Ia)	Изомальтоза	>99
Инвертаза (мальтаза Ib)	Мальтоза	~50
	Сахароза	100
	Мальтоза	~25
Мальтазы II и III (глюкамилаза, термостабильные мальтазы)	Мальтоза	~25
	Изомальтоза	<1
Трегалаза	Трегалоza	100
Лактаза	Лактоза	100
	Гетеро-β-галактозид	<50

возможно при своевременной и правильной диагностике. Наиболее прямым и точным методом установления причин непереносимости является определение активности дисахаридаз в материале биопсии слизистой тонкого кишечника человека.

МАТЕРИАЛ

Для определения активности дисахаридаз используют материал биопсии, взятый либо из слизистой тощей кишки, либо из области перехода двенадцатиперстной кишки в тощую. Для определения активности ферментов достаточно нескольких миллиграммов материала, однако для получения более точных результатов желательно иметь 10—20 мг (сырая масса) ткани. Материал биопсии помещают в пробирку, охлажденную льдом. Если ткань не может быть использована для определения активности дисахаридаз в течение 1—2 ч, то ее замораживают и хранят при -20°C .

Приготовление гомогената. 10—20 мг (сырая масса) ткани слизистой измельчают с 0,5 мл H_2O в маленьком гомогенизаторе со стеклянным пестиком, который предварительно и в процессе гомогенизирования охлаждают измельченным льдом. Гомогенизирование проводят в течение 1—2 мин при скорости вращения

200—300 об/мин. Большая скорость, а также недостаточное охлаждение могут привести к значительной потере ферментативной активности. Гомогенат можно хранить в замороженном состоянии. Замораживание и оттаивание не влияют на ферментативную активность.

Гомогенат разводят дистиллированной водой. В том случае, когда гомогенат готовят из 10—20 мг ткани в 0,5 мл H_2O , обычно используют следующие разведения: для определения мальтазной активности — 1 : 50; изомальтазной — 1 : 20; инвертазной — 1 : 20; трегалазной — 1 : 5; лактазной — 1 : 5. Об активности дисахаридов судят по количеству глюкозы, образующейся при расщеплении соответствующих дисахаридов. Определение глюкозы проводят специфическим глюкозооксидазным методом (И. С. Лукомская и В. К. Городецкий, 1961).

РЕАКТИВЫ

Дисахариды: мальтоза, изомальтоза, сахароза, трегалоза, лактоза.

0,1 М Na-фосфатный буфер (pH 6,0).

0,1 М малеатный буфер (pH 6,0). 1,16 г малеиновой кислоты растворяют в 15,3 мл 1 н. раствора NaOH и добавляют воды до 100 мл. Измеряют pH и, если нужно, доводят его до pH 6,0.

0,5 М ацетатный буфер (pH 4,8). Для его приготовления смешивают 240 мл 1 М раствора ацетата натрия, 160 мл 1 н. раствора уксусной кислоты и 400 мл воды.

0,1% раствор о-толидина (100 мг о-толидина растворяют в 10 мл абсолютного этанола).

Насыщенный водный раствор бензойной кислоты.

0,3 н. раствор $Ba(OH)_2$.

5% раствор $ZnSO_4$. При смешивании двух последних растворов в равных объемах активная реакция смеси должна быть нейтральной.

Субстрат готовят в виде 0,056 М раствора дисахарида в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 6,0) или в 0,1 М малеатном буфере (pH 6,0). Субстратно-буферный раствор хранят небольшими порциями в замороженном состоянии и оттаивают по мере необходимости.

Глюкозооксидазный реактив. 10 мг пероксидазы и 50 мг глюкозооксидазы отечественного производства с активностью 90 000 Q_{O_2} растворяют в 800 мл

0,5 М ацетатного буфера (рН 4,8). К полученному раствору добавляют 10 мл 0,1% раствора о-толидина, доводят объем до 1000 мл и фильтруют. Реактив хранят в темной склянке с притертой пробкой в холодильнике. Глюкозооксидазный реактив может быть использован в течение 1—2 мес.

Стандартный (исходный) раствор глюкозы. 90 мг глюкозы растворяют в 100 мл насыщенного водного раствора бензойной кислоты (5 мкмоль/мл). Такой раствор глюкозы можно хранить до 1 года.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В коническую пробирку наливают 0,1 мл разведенного гомогената и помещают в водяную баню при 37 °С. Через несколько минут в пробирку добавляют 0,1 мл субстратно-буферного раствора, пробу перемешивают и инкубируют при 37 °С, через 60 мин в пробирку быстро добавляют 0,3 мл H_2O и помещают на 2 мин в кипящую водяную баню для прекращения реакции. В качестве контроля смешивают в пробирке 0,1 мл разведенного гомогената, 0,3 мл H_2O и 0,1 мл субстратно-буферного раствора и сразу же помещают на 2 мин в кипящую водяную баню.

После охлаждения к инаktivированным пробам добавляют по 2,5 мл глюкозооксидазного реактива, в результате чего развивается синяя окраска пробы. В пробах измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при 620 нм против раствора, представляющего собой смесь 2,5 мл глюкозооксидазного реактива с 0,5 мл H_2O . Стандартные растворы глюкозы готовят разведением исходного раствора глюкозы так, чтобы в 0,5 мл раствора содержалось соответственно 0,1, 0,2 и 0,5 мкмоль глюкозы. К 0,5 мл стандартного раствора глюкозы добавляли 2,5 мл глюкозооксидазного реактива.

После прибавления глюкозооксидазного реактива к раствору, содержащему глюкозу, интенсивность образующейся окраски постепенно возрастает, достигает максимума через 13—16 мин, остается на этом уровне в течение нескольких минут, а затем постепенно уменьшается. Время наступления максимума интенсивности окраски, а также продолжительность времени, в течение которого максимальная окраска сохраняется, зависит от концентрации глюкозооксидазы в глюкозооксидазном

Активность дисахаридаз в слизистой тонкого
кишечника человека (Dahlqvist, 1970)

Дисахаридазы	Активность ед/г белка
Мальтаза	266 (111—420)
Изомальтаза	97 (25—183)
Инвертаза	87 (26—138)
Лактаза	44 (9—98)

Примечание. Биопсию брали в области перехода двенадцатиперстной кишки в тощую. Определение проводили у 22 взрослых здоровых людей. В скобках даны пределы колебаний активности дисахаридаз.

реактиве, от температуры, при которой проводят определение, и других факторов. Поэтому для каждой серии измерений следует определять время, необходимое для достижения максимума интенсивности окраски, и фотометрировать каждую пробу строго через этот промежуток времени (обычно через 14—16 мин после прибавления глюкозооксидазного реактива).

При определении инвертазной активности ферментативную реакцию останавливают с помощью $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и ZnSO_4 . Для этого к 0,2 мл проинкубированной пробы добавляют 0,3 мл H_2O , 0,1 мл 0,3 н. раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и 0,1 мл 5% раствора ZnSO_4 . Смесь перемешивают. К 0,5 мл контрольной пробы и стандартным растворам глюкозы также добавляют 0,1 мл 0,3 н. раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и 0,1 мл 5% раствора ZnSO_4 . Пробы центрифугируют в течение 10 мин при 1700g (5000 об/мин на центрифуге ЦУМ-1).

Из надосадочной жидкости отбирают 0,5 мл, приливают 2,5 мл глюкозооксидазного реактива и проводят определение, как описано выше.

Количество глюкозы, образующееся при расщеплении дисахарида, рассчитывают по калибровочной кривой, построенной при применении стандартных растворов глюкозы.

За единицу дисахаридазной активности принимают то количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 мкмоль дисахарида в 1 мин. Активность дисахаридаз выражают в единицах на 1 г белка (табл. 18).

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ N-АЦЕТИЛ- β -D-ГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ А ДЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ТЕЯ—САКСА И ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕТЕРОЗИГОТНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ

И. В. ЦВЕТКОВА, А. Б. КОЗИНА

Точный диагноз наследственных гликолипидозов, в частности болезни Тея—Сакса, может быть поставлен только путем определения активности фермента, дефект которого лежит в основе заболевания. Показано (Okada, O'Brien, 1969), что болезнь Тея—Сакса обусловлена резким снижением активности или отсутствием изофермента А N-ацетил- β -D-гексозаминидазы (КФ 3.2.1.52). Этот фермент катализирует отщепление конечного остатка N-ацетилгалактозамина от ганглиозида GM₂. Так как болезнь Тея—Сакса неизлечима и приводит к смерти в раннем детском возрасте, необходимо диагностировать заболевание до рождения ребенка, чтобы в случае подтверждения болезни плода возможно было произвести терапевтический аборт. Для постановки диагноза определяют активность N-ацетил- β -D-гексозаминидазы А в амниотической жидкости (АЖ) и ее клетках. Для профилактики болезни Тея—Сакса необходимо также выявлять гетерозиготных носителей болезни, у которых активность фермента составляет примерно половину таковой у контрольной группы людей. Активность N-ацетил- β -D-гексозаминидазы А определяют обычно в лейкоцитах и сыворотке крови. Кроме количественного определения активности фермента для пренатальной диагностики, используют также выявление N-ацетил- β -D-гексозаминидазы А с помощью электрофореза.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ N-АЦЕТИЛ- β -D-ГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ А

Принцип метода

Метод основан на том, что N-ацетилгексозаминидаза А термолabile и полностью инактивируется после пропревания сырого образца исследуемой ткани в течение 3 ч при 56°C и pH 5,0 (O'Brien e. a., 1970). В норме в тканях и жидкостях организма имеются две основ-

ные изоформы N-ацетил- β -D-гексозаминидазы — А и В, активность которых в сумме и составляет общую активность фермента. По разнице между активностью фермента до прогревания (общая активность форм А+В, принимаемая за 100%) и после прогревания (активность термостабильной формы В) вычисляют относительную активность изофермента А. В качестве субстрата используют п-нитрофенил- β -D-N-ацетилглюкозаминид («Koch-Light», Англия), при его расщеплении, которое катализирует N-ацетилгексозаминидаза А, образуется свободный фенол, его количество определяют с помощью спектрофотометра при 400 нм.

Объекты исследования

Сыворотку крови получают центрифугированием крови при 1000 g (4000 об/мин на центрифуге ЦУМ-1) в течение 30 мин. Для анализа достаточно иметь 0,25—0,5 мл сыворотки.

Для получения лейкоцитов 9 мл венозной крови смешивают с 1 мл 6% раствора ЭДТА (рН 7,0) и оставляют на ночь в холодильнике. Плазму полностью отсасывают с поверхности эритроцитарной массы и центрифугируют 15—20 мин в центрифуге с охлаждением при 300—600 g (малый ротор ЦЛР). Плазму удаляют, а осадок лейкоцитов гомогенизируют в 1 мл H_2O . Лейкоциты разрушают 4-кратным замораживанием и оттаиванием или добавлением тритона X-100 в конечной концентрации 0,2%. Полученный после центрифугирования экстракт лейкоцитов используют в качестве ферментного препарата.

Образцы амниотической жидкости (АЖ) в объеме 10 мл получают на 18-й неделе беременности с помощью амниоцентеза. АЖ центрифугируют 15 мин при 600 g (малый ротор ЦЛР) для отделения клеток. Последние гомогенизируют в 0,4—0,6 мл H_2O и далее обрабатывают таким же образом, как лейкоциты.

Ход определения

Исследуемые образцы смешивают с 0,1 М цитратным буфером (рН 4,8) — экстракты лейкоцитов или клеток АЖ в отношении 1:1, а АЖ и сыворотку в отношении 3:1 и 4:1 соответственно. Пробы делят попо-

лам, одну часть оставляют во льду, другую часть прогревают при 56 °С в течение 3 ч. Затем из каждой порции отбирают по две параллельные пробы по 0,2 мл, добавляют по 0,05 мл 7,5 мМ раствора п-нитрофенил-β-D-N-ацетилглюкозаминида и инкубируют при 37 °С в течение часа. К пробам добавляют по 0,35 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты, осадок белка удаляют центрифугированием при 600 g в течение 10 мин. К 0,2—0,4 мл надосадочной жидкости добавляют 0,4 М глициновый буфер (рН 10,4) до объема 3 мл. Оптическую плотность окрашенных проб измеряют при 400 нм на спектрофотометре СФ-4 и количество отщепившегося п-нитрофенола рассчитывают с помощью калибровочного графика.

Обычно в норме относительное содержание N-ацетил-β-D-гексозаминидазы А в сыворотке крови контрольных лиц составляет в среднем 52% (47—69); у гетерозиготных носителей — 35% (24—46); соответствующие значения для этого изофермента в лейкоцитах — 61% (55—69) и 40% (25—48).

Активность N-ацетил-β-D-гексозаминидазы А в АЖ контрольных лиц в среднем составляет 18% (12—29), а в клетках АЖ — 31% (17—46). Отсутствие активности фермента в АЖ или снижение ее до величины меньшей 10% следует считать указанием на болезнь Тея—Сакса у плода и беременность должна быть прервана. Если позволяет время, желательно определить активность N-ацетил-β-D-гексозаминидазы А в культуре клеток АЖ.

Для быстрого ответа при диагностическом исследовании АЖ можно использовать электрофоретическое выявление N-ацетил-β-D-гексозаминидазы А.

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ N-АЦЕТИЛГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ А С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА ГЕЛЕ АГАРОЗЫ

Метод основан на разнице в величине заряда изоформ А и В и, следовательно, разной электрофоретической подвижности этих N-ацетил-β-D-гексозаминидаз.

Электрофорез проводят в геле агарозы по методу, разработанному Оман и соавторами (Ohman e. a., 1971), используют пластинки, приготовленные следующим образом. На предметные стекла (2,5×8 см) наливают по 2 мл 1% раствора агарозы («Serva») в 0,04 М

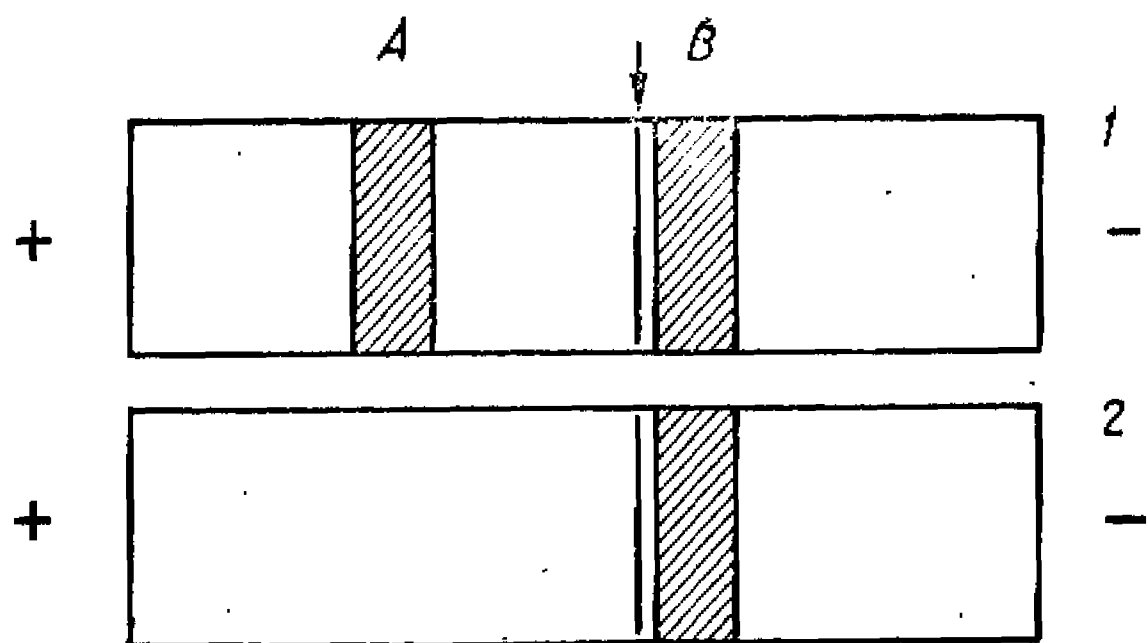


Рис. 9. Электрофоретическое разделение N-ацетил- β -D-гексозаминидаз А и В в геле агарозы.

1 — норма; 2 — болезнь Тея—Сакса.

фосфатно-цитратном буфере (рН 6,0), прогретого 30 мин на кипящей водяной бане. Пластинки выдерживают 24 ч во влажной камере при 2°C. В поперечную щель посередине геля наносят 10 мкл исходной или сгущенной в 2—3 раза АЖ или экстракта клеток АЖ. Шесть пластинок помещают в аппарат для электрофореза с охлаждением водой (3—5°C). Условия электрофореза: 0,04 М цитратно-фосфатный буфер (рН 6,0), напряжение 200 В, сила тока 50—60 мА, время электрофореза 1 ч. После электрофореза на поверхность геля наливают раствор субстрата — 1 мМ раствор 4-метилумбеллиферил- β -D-N-ацетилглюкозаминида («Koch-Light») в 0,1 М цитратном буфере (рН 4,4) и инкубируют 1 ч при 37°C. Затем субстрат сливают, пластинки осторожно обрызгивают 1 М глицин-карбонатным буфером (рН 11,0). Расположение А и В изоформ фермента определяют по флуоресценции отщепившегося от субстрата 4-метилумбеллиферона, выявляемой при освещении пластинок ультрафиолетовым светом с длиной волны 366 нм; для этого используют ультрафиолетовый осветитель типа ВЮ-1. N-ацетил- β -D-гексозаминидаза А выявляется в виде полосы, движущейся в сторону анода, а изоформа В фермента остается в месте нанесения или слегка сдвигается в сторону катода. При болезни Тея—Сакса у плода изоформа А не обнаруживается (рис. 9).

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЛИКОГЕНОЗОВ

И. А. ПОПОВА, И. В. ЧИБИСОВ

К гликогеновой болезни или гликогенозам относят наследственные заболевания, вызванные дефицитом или отсутствием активности того или иного фермента, участвующего в распаде гликогена. Гликогенозы характеризуются значительным накоплением гликогена в пораженных органах и тканях больного. К настоящему времени в мировой литературе описаны сотни случаев этого заболевания. Известно, что распространенность гликогеновой болезни соответствует 1 : 40 000.

По клинической картине различают печеночную, мышечную и генерализованную формы гликогеновой болезни. В зависимости от природы отсутствующего фермента гликогеновую болезнь классифицируют на ряд типов (табл. 19).

Биохимическая диагностика гликогенозов осуществляется в два этапа. На первом этапе проводят нагрузочные тесты некоторыми сахарами и гормонами. Применение этих нагрузок позволяет выделить гликогеновые заболевания из группы заболеваний, сходных с ними по клинической картине. На втором этапе проводят биопсию пораженных тканей (печень, мышцы) и определяют в них содержание и структуру гликогена, а также активность ферментов, участвующих в обмене гликогена. Только такая двухэтапная система обследования позволяет окончательно установить диагноз гликогеновой болезни и тип гликогеноза.

У больных с печеночной формой гликогеноза в крови (натощак и после нагрузок сахарами и гормонами) определяют содержание глюкозы, редуцирующих веществ и лактата. Для анализа берут 0,1 мл капиллярной крови. Белки осаждают 0,4 мл 0,3 н. раствора $ZnSO_4$ и 0,4 мл 0,3 н. раствора $NaOH$, доводят объем пробы до 2 мл водой, центрифугируют и в надосадочной жидкости определяют содержание:

1) глюкозы с помощью глюкозооксидазного метода (И. С. Лукомская, В. К. Городецкий, 1961);

2) редуцирующих сахаров по методу Нельсона (Nelson, 1944);

3) лактата крови с помощью п-оксидифенилового реактива (Barker, Summerson, 1941).

Классификация гликогенозов

Название болезни	Дефект фермента	Орган, в котором найден дефект фермента	Форма болезни
I тип, болезнь Гирке	Глюкозо-6-фосфатаза	Печень, почки, слизистая тонкого кишечника	Печеночная
II тип, болезнь Помпе	Кислая α -глюкозидаза	Печень, почки, селезенка, мышцы, лейкоциты, нервная ткань	Генерализованная
III тип, болезнь Кори	Амило-1,6-глюкозидаза	Печень, мышцы, лейкоциты, эритроциты	Печеночная, мышечная
IV тип, болезнь Андерсена	Ветвящий фермент	Печень, мышцы, лейкоциты	Печеночная
V тип, болезнь Мак-Ардля	Фосфорилаза	Мышцы	Мышечная
VI тип, болезнь Херса	Фосфорилаза	Печень	Печеночная
VII тип, болезнь Томсона	Фосфоглюкомутаза	Печень, мышцы	Печеночная, мышечная
VIII тип, болезнь Таруи	Фосфофруктокиназа	Мышцы, эритроциты	Мышечная
IX тип, болезнь Хага	Киназа фосфорилазы б	Печень	Печеночная
X тип	Протеинкиназа	Печень	Печеночная

НАГРУЗОЧНЫЕ ТЕСТЫ

Нагрузки сахарами

В течение 2 нед до начала нагрузок больные получают пищу, в которой количество жиров, углеводов и белков соответствует возрастным нормам. Через 12 ч по-

сле последнего приема пищи больному дают сахар в виде 25—30% водного раствора, исходя из следующего расчета:

Возраст	г. сахара/кг массы тела
0—6 мес	— 3,0
7—11 мес	— 2,5
1—3 года	— 2,0
4—16 лет	— 1,75
взрослый	— 1,0

Минимальная доза соответствует 10 г, а максимальная не превышает 50 г сахара.

У детей с выраженной гипогликемией, а также у больных до 1 года нагрузочные пробы начинают через 5—7 ч после последнего приема пищи. Капиллярную кровь отбирают за 15 мин и непосредственно перед приемом сахара, а также через 15, 30, 60, 90, 120, 150 и 180 мин после приема сахара.

Для больных с печеночной формой гликогеноза, кроме гликогеноза IV типа (дефицит ветвящего фермента), характерна гипогликемия. Гиперлактатемия и гипогликемия (натошак) характерны для больных с I типом гликогеноза (дефицит глюкозо-6-фосфатазы).

При нагрузках глюкозой практически при всех типах гликогенозов в крови наблюдают длительное повышение содержания глюкозы, а при III типе гликогеноза (дефицит амило-1,6-глюкозидазы) отмечают особый многогорбый характер гликемических кривых. Содержание лактата при гликогенозах всех типов (за исключением I типа) либо не изменяется, либо отмечается лишь незначительное его увеличение. При I типе гликогеноза нагрузка глюкозой приводит к характерному снижению содержания лактата в крови.

При выявлении печеночных форм гликогеноза большое значение имеет нагрузка галактозой. Введение галактозы вызывает значительный подъем содержания лактата в периферической крови больных гликогеновой болезнью. Ввиду опасности возникновения тяжелого ацидоза нагрузка галактозой не проводится у больных с подозрением на I тип гликогеноза. У больных с гликогенозом печени после нагрузки галактозой практически весь сахар, появляющийся в крови, идентифицируется как глюкоза, тогда как в норме гликемический подъем осуществляется за счет галактозы.

Адреналиновая нагрузка

При адреналиновой нагрузке кровь берут на анализ за 15 мин и непосредственно перед введением адреналина. Затем внутримышечно вводят 0,1% раствор адреналина из расчета 0,1 мл на каждый год жизни, но не более 1 мл. После инъекции адреналина кровь берут на анализ через 20, 40, 60, 80 и 100 мин.

Как известно, в норме введение адреналина приводит к повышению содержания глюкозы крови. При нагрузке адреналином у больных с гликогенозом I типа такое повышение не наблюдается. При III типе гликогеноза адреналиновая нагрузка, проведенная через короткое время после еды, вызывает такое же, как и в норме, увеличение содержания глюкозы крови, в то время как проведение нагрузки натощак не вызывает гликемического подъема. Исследование лактатемических кривых у больных с гликогеновой болезнью после введения адреналина не выявляет заметных отклонений от нормы, однако у больных с I типом гликогеноза после введения адреналина отмечают заметный подъем количества лактата в крови.

Ишемическая нагрузка

На первом этапе исследования у больных с мышечной формой гликогеноза проводят ишемическую нагрузку. Целью этого теста является выяснение нарушения в процессе распада гликогена в мышцах, о котором судят по количеству образовавшегося лактата после мышечной работы в условиях ишемии (Thomson, 1963). Исследование проводят натощак. Больному накладывают на руку две манжеты от сфингоманометра. Первую манжету накладывают на нижнюю треть предплечья, нагнетают воздух до 200 мм рт. ст. и оставляют до конца исследования. Это делается для того, чтобы исключить артерио-венозный шунт кисти. Вторую манжету накладывают на среднюю треть плеча, из локтевой вены берут пробу крови и нагнетают в манжету воздух до 200 мм рт. ст. Больной в течение 45 с работает, сжимая грушу от сфингоманометра исследуемой рукой. Через 2 мин после начала работы манжету, находящуюся на плече, снимают и на протяжении 10—15 мин отбирают из локтевой вены по 1 мл крови в пробирки, содержа-

щие по 5 мг NaF. Пробы центрифугируют и в плазме определяют концентрацию глюкозы и лактата. У здоровых людей при проведении ишемической нагрузки отмечается подъем лактата на 0,3—0,5 г/л, в то время как у больных с нарушением гликогенолиза мышц наблюдается либо отсутствие, либо незначительный (0,05—0,1 г/л) подъем уровня лактата в крови.

Для окончательного установления типа гликогеноза проводят биопсию печени и мышц. В биопсированных тканях определяют концентрацию и структуру гликогена, а также активность ферментов, участвующих в обмене гликогена, в первую очередь активности фосфоорилазы, амило-1,6-глюкозидазы, глюкозо-6-фосфатазы и кислой α -глюкозидазы.

АНАЛИЗ БИОПСИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ

Биопсия печени или мышц может проводиться либо с помощью пункции, либо при операции. Образцы немедленно помещают в сухие пластмассовые пробирки небольшого размера, герметически закрывают и быстро замораживают при -78°C с помощью сухого льда. Замороженные образцы могут храниться в течение нескольких дней. Оттаявшая по какой-либо причине ткань не может быть повторно заморожена и использована для последующего анализа, так как некоторые ферменты при этом инактивируются. Для получения минимальных сведений об активности ферментов и содержании в тканях гликогена достаточно 30 мг печени и 200 мг мышц. Для проведения полного анализа и получения некоторых дополнительных данных желательно иметь около 1 г ткани.

Определение содержания и структуры гликогена в тканях

Для выделения гликогена 10 мг печени или 100 мг мышц помещают в пробирку с 1 мл 30% раствора КОН и нагревают в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем пробы охлаждают, приливают 3 мл 96% этанола, оставляют на холоду на 5 ч. Образовавшийся осадок центрифугируют, 4 раза промывают 70% этанолом и высушивают в вакуум-эксикаторе. Содержание гликогена в пробе определяют после его кислотного или фер-

ментативного гидролиза, измеряя количество образовавшейся глюкозы с помощью глюкозооксидазного метода. Для этого полученный осадок гликогена растворяют в 2 мл воды и отбирают пробы по 0,1 мл для гидролиза.

При кислотном гидролизе к 0,1 мл раствора приливают 0,5 мл 1 н. раствора H_2SO_4 и нагревают в течение 3 ч в кипящей водяной бане. Пробу охлаждают, нейтрализуют 1 н. раствором $NaOH$ по фенолфталеину и определяют количество образовавшейся глюкозы. При ферментативном гидролизе к 0,1 мл раствора приливают 0,2 мл 0,2 М ацетатного буфера (pH 4,8), содержащего 5 мг/мл ферментного препарата амилоглюкозидазы, полностью превращающей гликоген в глюкозу. Общий объем смеси доводят до 1 мл дистиллированной водой.

Инкубируют в течение 3 ч при $30^\circ C$ и непосредственно в пробе определяют содержание глюкозы. Для расчета содержания гликогена полученное количество глюкозы умножают на коэффициент 0,93.

В тех случаях, когда количество печеночной ткани минимально и недостаточно для выделения гликогена, используют более простой способ определения его содержания в печени (Huijing, 1970). Для этого к 0,1 мл 1% гомогената ткани приливают 0,2 мл 0,2 М ацетатного буфера (pH 4,8), в котором растворена амилоглюкозидаза в концентрации 5 мг/мл. Инкубируют 3 ч при $30^\circ C$ и в пробе определяют количество глюкозы.

Исследование структуры выделенного гликогена проводят с помощью метода, предложенного Крисман (Krisman, 1962), и с помощью β -амилолиза.

Метод Крисман заключается в получении спектра поглощения комплекса полисахарида с йодом и определении положения максимума поглощения, которое зависит от структуры исследуемого полисахарида. Так, например, максимум поглощения комплекса йода с гликогеном соответствует 410—460 нм, с лимит-декстрином (гликогеном с укороченными в результате действия фосфоорилазы внешними цепями) — 390 нм, с амилопектином — 540 нм. Для исследования к пробе объемом 0,2 мл, содержащей от 30 до 50 мкг гликогена, приливают 1,3 мл реактива Крисман. Реактив готовят, смешивая непосредственно перед употреблением 26 мл 5,55 М раствора $CaCl_2$ с 0,1 мл 2,6% раствора I_2 в 26% водном растворе KI . Получают спектр поглощения (в микро-

кюветах) на спектрофотометре при длинах волн от 350 до 620 нм.

О структуре полисахарида судят также по степени его распада под действием β -амилазы. Известно, что под действием этого фермента распад гликогена составляет $\sim 50\%$, лимит-декстрина $\sim 15\text{—}20\%$, амилопектина $\sim 65\%$. Для определения берут 0,4 мл раствора, содержащего около 40 мкг полисахарида, приливают 0,1 мл 0,02 М ацетатного буфера (рН 5,0), в котором растворен сухой препарат β -амилазы («Serva») в концентрации 2 мг/мл. Реакцию останавливают добавлением 0,1 мл 0,3 н. раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и 0,1 мл 0,3 н. раствора ZnSO_4 . Пробы центрифугируют, в надосадочной жидкости определяют редуцирующие сахара методом Нельсона. Точную концентрацию полисахаридов в пробе устанавливают описанным выше ферментативным методом, после чего рассчитывают процент распада полисахарида под действием β -амилазы.

Определение активности ферментов

Для определения активности ферментов в тканях используют микрометоды (Hers, 1964). С этой целью образцы тканей, полученные при биопсии, взвешивают, измельчают и гомогенизируют с 9- и 99-кратным количеством дистиллированной воды. Гомогенаты хранят во льду в течение нескольких часов исследования либо замораживают. Повторные замораживание и оттаивание гомогенатов, в особенности более разбавленных, приводят к потере активности некоторых ферментов, поэтому в первую очередь исследуются наиболее лабильные ферменты — фосфорилаза и глюкозо-6-фосфатаза.

Фосфорилаза (1,4- α -D-глюкан:ортофосфат- α -глюкозил-трансфераза, КФ 2.4.1.1)

Фосфорилаза катализирует обратимый перенос глюкозильного остатка от нередуцирующего конца в молекуле гликогена к неорганическому фосфату. Фермент существует в нескольких взаимопревращающихся формах: среди них различают «активные» и «неактивные». «Активные» фосфорилазы выявляют свою активность в отсутствие и АМФ. «Неактивные» либо неактивны в присутствии АМФ, как, например, в печени, либо активны только в присутствии АМФ, как, например, фосфорилаза б в мышцах.

Таким образом, в печени возможно определение только активной фосфорилазы, в то время как в мышцах — общей (в присутствии АМФ) и отдельно активной (в отсутствие АМФ).

Для определения активности фосфорилазы в гомогенатах тканей используют способность фермента освобождать неорганический фосфат из глюкозо-1-фосфата в присутствии или отсутствии АМФ. Субстратная смесь содержит 0,1 М глюкозо-1-фосфат, 2% гликоген, 0,03 М АМФ и 0,2 М NaF (рН 6,1). К 0,05 мл субстратной смеси добавляют 0,05 мл 1% гомогената ткани и инкубируют при 37 °С в течение 0, 10, 20, 40 мин. После окончания инкубации к пробам добавляют 0,5 мл 10% раствора ТХУ и 3,7 мл ледяной дистиллированной воды. Выпавшие в осадок белки удаляют центрифугированием, а в надосадочной жидкости определяют количество образовавшегося неорганического фосфата по методу Фiske—Суббароу. Для этого к пробе добавляют 0,5 мл смеси, состоящей из равных количеств 2,5% раствора молибдата аммония и 5 н. раствора H_2SO_4 и 0,2 мл основного раствора эйконогена. Через 10 мин определяют оптическую плотность раствора при 620 нм и рассчитывают количество неорганического фосфата. В этих условиях количество освобождающегося неорганического фосфата пропорционально времени инкубации и количеству фермента.

Активность фермента выражают в единицах, соответствующих микромолям фосфора, освобождаемого за 1 мин 1 г ткани. Для печени в норме эти величины составляют от 15 до 55 ед., а для мышц — от 60 до 140 ед. Обычно полное отсутствие фосфорилазы в скелетных мышцах отмечают при болезни Мак-Ардля (гликогеноз V типа). Для гликогеноза VI типа характерно снижение активности фосфорилазы печени.

Амил-1,6-глюкозидаза (декстрин-6- α -глюкозидаза, КФ 3.2.1.33)

Амил-1,6-глюкозидаза — фермент, катализирующий расщепление α -1,6-связи в точках ветвления молекулы гликогена. При фосфоролизе гликогена образуется лимит-декстрин, который вначале подвергается действию олиго-1,4-1,4-глюкантрансферазы (трансферирующая активность фермента) и затем происходит гидролитическое

отщепление глюкозы под действием амило-1,6-глюкозидазы (гидролитическая активность фермента).

Обычно, чтобы определить активность этого фермента в ткани, используют в качестве субстрата лимит-декстрин гликогена и определяют количество глюкозы, образовавшейся при обработке этого субстрата гомогенатом ткани. Берут 0,05 мл 1% гомогената ткани, смешивают с 0,05 мл субстратной смеси, содержащей 2% фосфорилазный лимит-декстрин, полученный по методу Херса (Hers, 1964), 0,1 М гистидин (рН 6,5) и 5 мМ ЭДТА. Смесь инкубируют при 37 °С в течение 2 ч. Контрольные пробы не подвергают инкубации. Чтобы учесть действие на субстрат других глюкозидаз, имеющих в гомогенате ткани, гомогенаты инкубируют также с субстратной смесью, содержащей вместо лимит-декстрина гликоген в тех же количествах. После окончания инкубации белки осаждают смесью равных объемов (по 0,05 мл) 0,15 М раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и 0,15 М раствора ZnSO_4 , добавляют 0,5 мл H_2O и осадок удаляют центрифугированием. В надосадочной жидкости определяют количество образовавшейся глюкозы с помощью глюкозооксидазного метода и выражают активность амило-1,6-глюкозидазы в единицах, отвечающих количеству микромолей глюкозы, образовавшейся за 1 мин в расчете на 1 г ткани.

Для печени и мышц в норме активность амило-1,6-глюкозидазы колеблется в пределах 0,4—1,2 и 0,2—0,7 ед. соответственно. Полное отсутствие амило-1,6-глюкозидазы в печени и мышцах характерно для гликогеноза III типа. В зависимости от локализации дефицита фермента (печень, мышцы) и от того, какая из активностей амило-1,6-глюкозидазы отсутствует — трансферирующая или гидролитическая, — различают 4 подтипа гликогеноза III (а, б, с, д). Особенностью гликогеноза III типа является накопление в пораженных тканях гликогена с укороченными внешними цепями — лимит-декстрина. Поэтому гликогеноз III типа называют лимит-декстринозом.

Глюкозо-6-фосфатаза (D-глюкозо-6-фосфат-фосфогидролаза, КФ 3.1.3.9)

Глюкозо-6-фосфатаза — специфический фермент, катализирующий отщепление фосфата от глюкозо-6-фосфата. У человека этот фермент обнаружен в печени,

почках и слизистой тонкого кишечника. В гомогенатах печени глюкозо-6-фосфатаза полностью инактивируется при температуре 37°C и pH 5,0 в течение нескольких минут. Определение активности глюкозо-6-фосфатазы основано на освобождении неорганического фосфата от глюкозо-6-фосфата при инкубации последнего с гомогенатом ткани. В присутствии ЭДТА ферментативная реакция линейна в течение 1 ч (нарастание количества фосфора прямо пропорционально времени). Для определения активности глюкозо-6-фосфатазы 0,1 мл смеси, состоящей из 0,1 М динатриевой соли глюкозо-6-фосфата в 2 мМ ЭДТА (pH 6,5), смешивают с 0,1 мл 1% гомогената ткани и инкубируют в течение 60 мин при 37°C . Контрольные пробы не инкубируют. При определении активности этого фермента в гомогенатах ткани очень важно, особенно если активность его мала, учитывать гидролиз субстрата неспецифическими фосфатазами. С этой целью ставят контрольные пробы, в которых специфическая глюкозо-6-фосфатаза инактивируется инкубацией при кислых значениях pH. Для этого к 0,1 мл 1% гомогената ткани добавляют 0,01 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 5,0) и инкубируют 5 мин при 37°C , затем к смеси добавляют субстрат и инкубируют 60 мин. После окончания инкубации опытных и контрольных проб определяют в них количество образовавшегося неорганического фосфата по методу Фiske—Суббароу и рассчитывают активность специфической глюкозо-6-фосфатазы, выражая ее к микромолям фосфата, образованного за 1 мин в расчете на 1 г ткани. В печени человека активность глюкозо-6-фосфатазы в норме составляет 4—13 ед. Полное отсутствие фермента характерно для болезни Гирке (гликогеноз I типа).

**Кислая α -глюкозидаза (1,4- α -D-глюкан-
глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3)**

Кислая α -глюкозидаза отщепляет глюкозу от наружных ветвей молекул полисахаридов, олигосахаридов и мальтозы. Фермент проявляет максимальную активность в области pH 4,0—5,0 и локализован в лизосомах. Чаще всего в гомогенатах тканей, взятых при биопсии, определяют способность их гидролизовать мальтозу с образованием глюкозы. Для этого к смеси, состоящей из 0,05 мл 0,5% раствора мальтозы и 0,05 мл 0,1 М аце-

татного буфера (рН 4,0), добавляют 0,05 мл 1% гомогената печени (или 10% гомогената мышц) и инкубируют 2 ч при 37°C. Контрольные пробы не инкубируют. Реакцию останавливают добавлением равных (по 0,05 мл) объемов 0,15 М раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и 0,15 М раствора ZnSO_4 , центрифугируют и в надосадочной жидкости определяют количество образовавшейся глюкозы с помощью глюкозооксидазного метода. Активность кислой α -глюкозидазы выражают в микромолях глюкозы, образовавшейся за 1 мин в расчете на 1 г ткани. Для печени и мышц человека активность α -глюкозидазы в норме колеблется в пределах 0,6—2,4 и 0,05—0,15 ед. соответственно. Отсутствие кислой α -глюкозидазы в печени, сердце и скелетных мышцах характерно для болезни Помпе (гликогеноз II типа).

Таким образом, для диагностики гликогеноза и его типа необходимо одновременное проведение всех описанных выше анализов.

ЧАСТЬ ВТОРАЯ

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ, БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ИХ ОБМЕНЕ

ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИКАТЕПСИНА (ПЕПТИДИЛ-ДИПЕПТИДАЗЫ) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПО ТРИПЕПТИДУ АНГИОТЕНЗИНА I

**Л. В. ПАВЛИХИНА, Ю. Е. ЕЛИСЕЕВА,
В. Ф. ПОЗДНЕВ, В. Н. ОРЕХОВИЧ**

Одним из компонентов системы регуляции содержания в тканях организма вазоактивных пептидов—антагонистов ангиотензина II и брадикинина, является фермент карбоксикатепсин (пептидил-дипептидаза, КФ 3.4.15.1), впервые выделенный из почек быка в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР (Ю. Е. Елисеева, В. Н. Орехович, 1963). Согласно нашим исследованиям (Ю. Е. Елисеева, В. Н. Орехович, Л. В. Павлихина, Л. П. Алексеенко, 1970), а также данным других авторов (Yang e. a., 1970), пептидил-дипептидаза не только катализирует превращение ангиотензина I в ангиотензин II, но также разрушает брадикинин.

Для определения активности этого фермента предложено несколько методов, отличных по способу идентификации конечных продуктов реакции, образующихся в результате расщепления ферментом синтетических субстратов. Из них наиболее простым и достаточно точным, с нашей точки зрения, является метод, предложенный Пиквилоудом и соавт. (Piquilloud e. a., 1970). Исходя из работ этих исследователей, нами были разработаны условия определения активности карбоксикатепсина в сыворотке крови человека.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на флуориметрическом определении гистидил-лейцина, отщепляющегося под действием карбоксикатепсина от С-концевого трипептида ангиотензи-

на I—кбз-фен-гис-лей. Гистидил-лейцин (так же как свободный гистидин и пептиды, содержащие на N-конце гистидин со свободной α -аминогруппой) в щелочной среде образует с о-фталевым диальдегидом стойкий флуороген. Исходный субстрат, не имеющий свободной аминогруппы гистидина, не реагирует с диальдегидом и, следовательно, не флуоресцирует. Таким образом, по нарастанию интенсивности флуоресценции в исследуемом растворе можно судить об активности содержащегося в нем карбоксикатепсина.

Метод прост в выполнении, требует малой затраты времени и по чувствительности не уступает радиоизотопному. Для проведения определения достаточно 0,003 мл сыворотки крови.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Сыворотка крови. Для определения используют цельную сыворотку крови, которую можно хранить в замороженном состоянии в течение 7—10 дней. При этом активность карбоксикатепсина практически не изменяется.

1 мМ раствор гистидил-лейцина (исходный стандартный раствор) 5,36 мг гистидил-лейцина растворяют в 20 мл перегнанного метилового спирта, подкисленного 0,2 н. раствором HCl (около 0,2 мл). Раствор хранят в посуде с притертой пробкой в холодильнике.

о-Фталевый диальдегид. Продажный реактив перекристаллизовывают из горячего гептана или гексана. Для этого навеску диальдегида растворяют в минимальном количестве гептана, нагревая на водяной бане. Раствор осторожно сливают с коричневого нерастворившегося осадка и ставят в холодильник. Выпавшие кристаллы (светло-лимонного цвета) отсасывают и сушат над хлоридом кальция; хранят в холодильнике в темной склянке. Непосредственно перед определением готовят 1% раствор в перегнанном метаноле.

0,2 М раствор трис*. 2,42 г трис растворяют в 100 мл бидистиллированной воды; хранят в холодильнике.

0,2 н. раствор HCl.

0,05 М трис-HCl буфер (рН 7,4). К 50 мл 0,2 М раствора трис добавляют 41—42 мл 0,2 н. раствора HCl

* Все водные растворы готовят на бидистиллированной воде. Используют реактивы только квалификации х. ч. или перекристаллизованные.

(контролируют по рН-метру) и доводят до 200 мл бидистиллированной водой. К готовому буферу добавляют NaCl до концентрации 0,1 М (5,85 г на 100 мл). Хранят в холодильнике не более 7 дней.

2 н. раствор NaOH.

6 н. раствор HCl.

0,9% раствор NaCl.

20% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Продажная ТХУ содержит примеси, гасящие флуоресценцию. Для удаления этих веществ ТХУ перегоняют с воздушным холодильником на песчаной бане. Собирают фракции с температурой кипения 195,5 °C.

Спирт метиловый. Перегоняют на водяной бане, собирают фракции с температурой кипения 64 °C.

Субстрат — N- α бензилоксикарбонил-L-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцин (сокращенно кбз-фен-гис-лей).

а) Синтез. 1 г гистидил-лейцина (препарат фирмы «Reanal») и 1 г NaHCO₃ растворяют в 10 мл воды при перемешивании магнитной мешалкой и умеренном нагревании (~40 °C). К раствору добавляют 10 мл изопропилового спирта, охлаждают до ~20 °C и при перемешивании добавляют порциями раствор 2 г N-оксисукцинимидного эфира N- α бензилоксикарбонилфенилаланина (Anderson e. a., 1964) в 10 мл диоксана. Смесь оставляют на 10—12 ч при ~20 °C, затем разбавляют водой до 100 мл и упаривают до половины объема в вакууме на роторном испарителе при температуре не выше 40 °C. Оставшийся водный раствор экстрагируют этилацетатом (дважды по 15 мл), этилацетатный экстракт промывают 10 мл 5% раствора Na₂CO₃. Промытый водный раствор и содовые вытяжки объединяют и удаляют растворенный в воде этилацетат в токе воздуха или в вакууме. После этого раствор подкисляют 3 мл ледяной уксусной кислоты и перемешивают магнитной мешалкой в течение 1 ч. Образовавшийся осадок пептида отфильтровывают и промывают водой (50 мл). Сырой пептид смешивают с 20—25 мл этилового спирта, нагревают до кипения и охлаждают до 5—10 °C. Осадок отфильтровывают, промывают спиртом (около 10 мл), эфиром и сушат в вакуум-эксикаторе над силикагелем и CaCl₂. Получают 1,7 г пептида, т.пл. 214°—216°C, $[\alpha]_D^{20}$ 15±1 (1% раствор в диметилформамиде), Rf 0,15 при хроматографии на пластинках «Силуфол» в системе ацетонитрил: NH₃—9:1.

б) 1 мМ раствор субстрата. К 5,5 мг кбз-фен-гис-лей добавляют 5 мл метанола и 1 мл бидистиллированной воды, растворяют и доводят до 10 мл метанолом.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИКАТЕПСИНА

0,1 мл исследуемой сыворотки разводят 3,5 мл 0,9% раствора NaCl. К 1,8 мл 0,05 М трис-HCl буфера приливают 0,1 мл разведенной сыворотки и пробы помещают в термостат при 38°C. Через 10 мин добавляют 0,1 мл субстрата (0,1 мкмоля) и инкубируют в течение 2 ч, реакцию останавливают добавлением 0,4 мл 20% раствора ТХУ. В контрольные пробы субстрат добавляют только после ТХУ. Осадок белка удаляют центрифугированием при 2000 g в течение 15 мин. К 1,7 мл центрифугата приливают 0,3 мл 2 н. раствора NaOH (для нейтрализации ТХУ) и 1 мл трис-HCl буфера (pH 7,4). Общий объем пробы составляет 3 мл. Одновременно готовят стандартную пробу, содержащую 10 нмоль гистидил-лейцина. Для этого исходный стандартный раствор разводят бидистиллированной водой в мерной колбе в 100 раз (до концентрации 0,01 мкмоля/мл) и к 1 мл разведенного стандартного раствора добавляют 2 мл бидистиллированной воды. Контролем к стандартным пробам служит проба, содержащая 3 мл бидистиллированной воды.

Для проведения флуориметрической реакции к пробам (стандартным и исследуемым) добавляют по 0,4 мл 2 н. раствора NaOH и 0,1 мл 1% раствора о-фталевого диальдегида. Через 6 мин (по секундомеру) после начала добавления диальдегида к пробам приливают по 0,2 мл 6 н. раствора HCl (для стабилизации флуоресценции). Интенсивность флуоресценции измеряют на флуориметре с первичным светофильтром 370 нм и вторичным — 500 нм. Флуоресценция стабильна в течение 1½ ч после добавления к пробам HCl.

Активность карбоксикатеписина выражают в нмолях гистидил-лейцина, освобождаемого ферментом, содержащимся в 1 мл цельной сыворотки за 1 мин. Расчет активности проводят по формуле:

$$A \text{ нмоль/мл/мин} = \frac{\Phi_{\text{пр}}}{\Phi_{\text{ст}}} \cdot 10 \cdot \frac{1}{120} \cdot \frac{2,4}{1,7} : \frac{1}{360} = \\ = \frac{\Phi_{\text{пр}}}{\Phi_{\text{ст}}} \cdot 42,4,$$

где A — активность карбоксикатепсина сыворотки; $\Phi_{\text{пр}}$ — флуоресценция исследуемой пробы (за вычетом флуоресценции контрольной пробы); $\Phi_{\text{ст}}$ — флуоресценция стандарта (за вычетом флуоресценции воды); 10 — содержание гистидил-лейцина в стандартной пробе в нмолях; 120 — время инкубации в минутах; 2,4 — общий объем исследуемой пробы; 1,7 — объем центрифугата, взятого для флуориметрической реакции; $\frac{1}{360}$ — количество цельной сыворотки в мл, внесенное в инкубационную пробу.

В норме у человека активность карбоксикатепсина сыворотки крови в нмоль/мл/мин равна $14 \pm 0,5$ ($M \pm \pm m$), $\sigma = \pm 3,7$.

Ограничения метода

1) Следует учитывать, что некоторые лекарства (например, резерпин) мешают определению, усиливая флуоресценцию контрольных и опытных проб.

2) В присутствии солей аммония образуется синий осадок.

3) Ионы двухвалентных металлов гасят флуоресценцию.

4) Для определения нельзя использовать цитратную и оксаладную плазму, так как в присутствии этих солей активность карбоксикатепсина резко снижается. Гепарин не мешает определению.

ВЫДЕЛЕНИЕ АНГИОТЕНЗИНОГЕНА ИЗ БЕЛКОВОЙ ПАСТЫ — ОТХОДА ПРОИЗВОДСТВА ГАММА-ГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Л. П. АЛЕКСЕЕНКО

Почки человека и животных выделяют в плазму крови узкоспецифический протеолитический фермент ренин (Naas e. a., 1965), гидролизующий пептидную связь в белке ангиотензиногене между остатками 10 и 11. При этом отделяется десятичленный пептид ангиотензин I, который, подвергаясь действию карбоксикатепсина (Eliseeva e. a., 1971), превращается в восьмичленный пептид ангиотензин II, обладающий высокой биологической активностью. Ангиотензин II стимулирует секрецию альдостерона надпочечными железами и вызывает

сокращение гладкой мускулатуры кровеносных сосудов, повышая артериальное давление. Было показано, что при некоторых симптоматических гипертониях активность ренина в плазме крови больных значительно изменяется. На основе этого были разработаны методы дифференциальной диагностики, позволяющие в сомнительных случаях выявить существование гормонально-активной опухоли коркового слоя надпочечников — альдостеромы.

Субстрат ренина, ангиотензиноген, представляет собой белок из α_2 -глобулиновой фракции сыворотки крови с относительной молекулярной массой 57 000. Его выделение в гомогенном состоянии довольно трудоемко и требует наличия специального оборудования. Однако вследствие высокой специфичности ренина нет особой необходимости в очистке ангиотензиногена до гомогенного состояния. Препарат должен быть достаточно обогащен субстратом и не должен содержать примеси протеолитических ферментов, способных разрушать образующийся ангиотензин.

Для определения активности ренина (и псевдоренина) в плазме больных лучше использовать субстрат, полученный из сыворотки крови человека. Но донорская кровь слишком дорога, а сырье для получения препарата должно быть по возможности дешевым.

Обобщив опыт работы по выделению субстратов ренина из различного материала, мы предлагаем метод выделения препарата ангиотензиногена из белковой пасты, представляющей из себя отход при промышленном получении препаратов γ -глобулина и сывороточного альбумина из плацентарной крови людей. В основу выделения положен метод Skeggs и соавторов (Skeggs e. a., 1964)*.

ХОД ВЫДЕЛЕНИЯ АНГИОТЕНЗИНОГЕНА

1 кг белковой пасты Б-О, соответствующей фракции IV—4 при спиртовом фракционировании сыворотки крови по Кону, размешивают в 30 л 0,9% раствора NaCl до получения 10% концентрации белка в растворе (рН 4,5). Раствор охлаждают до 6—8°C и реакцию среды доводят с помощью 2,5 н. раствора NaOH до рН 6,5, добавляя щелочь по каплям при перемешивании раствора (примерно 8—10 мл на 1 л).

Первое осаждение

К белковому раствору добавляют на 1 л по 470 мл насыщенного (4 М) раствора сульфата аммония до концентрации этой соли в растворе 1,3 М. Спустя 1 ч после того, как осадок сформировался, суспензию фильтруют через складчатые фильтры в течение ночи. Осадок отбрасывают, к фильтрату добавляют на 1 л 600 мл насыщенного раствора сульфата аммония до концентрации 2,3 М. Суспензию оставляют фильтроваться через складчатые фильтры на ночь. Фильтрат отбрасывают, осадок переносят на воронку Бюхнера и удаляют оставшийся фильтрат путем отсасывания при пониженном давлении. Плотный осадок переносят в целлофановые мешочки и диализуют против проточной водопроводной воды в течение ночи. Полученный раствор объединяют, измеряют его объем и концентрацию белка (измерения по Лорури и по поглощению при 280 нм дают в данном случае сходные результаты), после чего разбавляют раствор холодной дистиллированной водой до 5% концентрации белка.

Второе осаждение

К 1 л раствора добавляют 613 мл насыщенного раствора сульфата аммония до 1,5 М концентрации его. Осадок отделяют фильтрованием через складчатые фильтры в течение ночи. К фильтрату добавляют насыщенный раствор сульфата аммония из расчета 460 мл на 1 л до концентрации 2,3 М. Осадок собирают с фильтров и уплотняют его при отсасывании (на холоду) на воронке Бюхнера. На этой стадии осадок имеет зеленоватый цвет.

Щелочная обработка ЭДТА для инактивации ангиотензираз

Осадок растворяют в дистиллированной воде до 5% концентрации белка. Раствор имеет желто-зеленый цвет. Раствор нагревают до 25 °С. Добавляют ЭДТА- Na_2 из расчета 26 г на 1 л.

Доводят рН раствора до 8, добавляя по каплям 2,5 н. раствора NaOH из расчета 20 мл на 1 л. Оставляют на 1 ч при комнатной температуре. Раствор ох-

лаждают до 8 °С, рН доводят до 5,35, добавляя по каплям 2,5 н. раствор соляной кислоты (примерно 40 мл на 1 л раствора).

Третье осаждение

Доводят концентрацию сульфата аммония в полученном растворе до 1,2 М добавлением 400 мл насыщенного раствора этой соли на 1 л. Осадок отделяют фильтрованием. В фильтрате концентрацию сульфата аммония доводят до 2,3 М, добавляя 670 мл насыщенного раствора на 1 л фильтрата.

Осадок собирают, уплотняют путем отсасывания фильтрата и диализуют против проточной водопроводной воды (2 сут), затем против 0,9% раствора хлорида натрия (2 сут). Полученный в результате диализа раствор лиофилизируют и получают сухой препарат частично очищенного ангиотензиногена. Метод выделения может быть представлен следующей схемой (схема III).

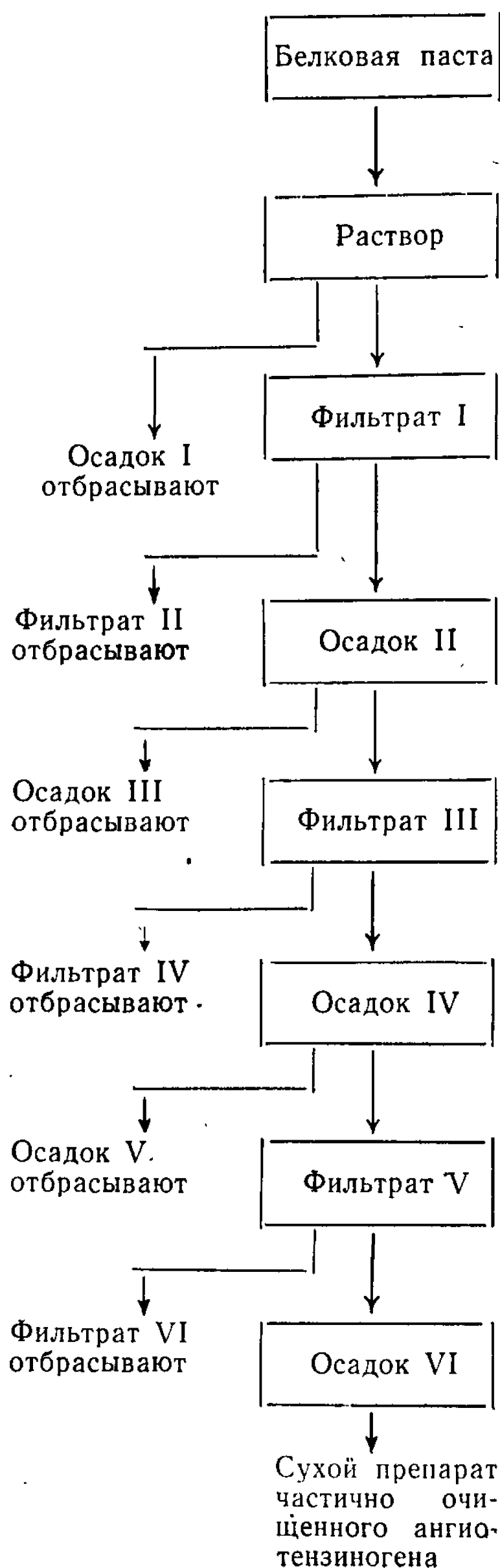
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АНГИОТЕНЗИНОГЕНА В ПРЕПАРАТЕ

Биологическое определение

0,5 мл препарата ангиотензиногена (20 мг/мл) и 0,5 мл препарата ренина (25 мкг/мл) в 0,01 М Na-фосфатном буфере (рН 6,5), содержащем 0,5 мг/мл ЭДТА-Na₂ инкубируют 1 ч при 37 °С. Белки осаждают нагреванием на кипящей водяной бане 3 мин и удаляют центрифугированием. Безбелковый центрифугат, содержащий ангиотензин I, по 0,1—0,2 мл вводят крысам, подготовленным для биоопределений. Пробы разводят в 2,5 и 10 раз 0,9% раствором NaCl.

При биологическом определении содержания ангиотензиногена в препарате измеряют прирост артериального давления у нефрэктомированных белых крыс. Нефрэктомию у крыс производят за 18—20 ч до проведения определения. Для анестезии подопытных животных применяют этаминал-натрий в физиологическом растворе, который вводят внутрибрюшинно из расчета 5 мг на 100 г массы тела. Непосредственно перед опытом у животных производят ваготомию, вставляют в сонную артерию канюлю и соединяют ее с ртутным манометром. Обнажают бедренную вену, вставляют в нее канюлю

Выделение препарата ангиотензиногена из белковой пасты



Разведение 0,9% раствора NaCl до 10% концентрации белка в растворе (рН 4,5)

Осаждение белков при концентрации сульфата аммония 1,3 М

Осаждение белков при концентрации сульфата аммония 2,3 М

Диализ; разведение раствора белков до 5%; рН 6,5, осаждение белков при концентрации сульфата аммония 1,5 М

Осаждение белков при концентрации сульфата аммония 2,3 М

Разведение раствора белков до 5%; добавление ЭДТА до 2,6%, рН 8,0; инкубация при 25 °С 1 ч, осаждение белков при концентрации сульфата аммония 1,2 М, рН 5,3

Осаждение белков при концентрации сульфата аммония 2,3 М

Диализ; лиофилизация

для инъекций. В качестве стандарта вводят в вену растворы валин-5-ангиотензина II (CIBA), так как содержание ангиотензиногена принято выражать в ангиотензиновых единицах.

Стандартные растворы должны содержать 2,5—16,0 нг ангиотензина II в 0,1 мл. Для предотвращения тромбообразования полиэтиленовую трубку, соединяющую сонную артерию с манометром, заполняют раствором гепарина в 0,9% растворе NaCl. Перед началом опыта гепарин вводят и в бедренную вену. Опытные пробы вводят между двумя инъекциями стандартных растворов. Нельзя вводить пробы, содержащие ионы калия, так как ионы калия сами по себе вызывают повышение артериального давления.

Проба на присутствие ангиотензина в препарате. 100 нг ангиотензина II инкубируют с 10 мг препарата ангиотензиногена в 1 мл Na-фосфатного буфера (pH 6,5) в течение 1, 4, 6, 20 и 48 ч. После тепловой денатурации белков и их удаления пробы вводят крысам для определения количества образовавшегося ангиотензина.

Химическое определение

В реакционный сосуд (реактор-колонка) специальной конструкции (рис. 10) помещают 2 мл раствора ангиотензиногена (содержащего 200—300 мг препарата по сухой массе), 100 мкг ренина в 0,5 мл 0,01 М Na-фосфатного буфера (pH 6,5) и 1 мл влажного осадка ионообменной смолы Дауэкс 50X2, промытой тем же буфером. Реактор-колонку помещают в горизонтальном положении в шуттель-аппарат и встряхивают в течение 4 ч. По истечении срока инкубации реактор-колонку ставят в штатив в вертикальное положение. Смола оседает и заполняет узкую часть колонки. Над колонкой помещают резервуар с аммонийно-ацетатным буфером (pH 6,7) и, пропуская 10—15 мл этого буфера, отмывают смолу от несвязавшихся белков. Далее смолу промывают 5 мл 10% раствора уксусной кислоты и 100 мл воды до нейтральной реакции.

Образовавшийся в результате катализируемой ренином реакции гидролитического расщепления ангиотензиногена ангиотензин удерживается смолой, его элюируют 5 мл 0,2 М раствора диэтиламина. Элюат выпаривают в вакууме при замораживании, промывают 1 мл

96% этанола и снова упаривают в вакууме досуха для удаления диэтиламина.

Пробы наносят на пластинки для тонкослойной хроматографии из силикагеля КСК и проводят разделение в системах: 2-бутанол — 3% раствор аммиака (25:11 по объему) и н. бутанол — аммиак — вода (120:7:7 по объему). Проявляют образующиеся ангиотензины по Паули (на содержание остатков гистидина в пептидах).

ОЦЕНКА МЕТОДА

Из 1 кг белковой пасты получали 50—55 г лиофилизированного препарата с содержанием ангиотензиногена примерно 400 крысиных единиц Гольдблатта на 1 г белка. За единицу Гольдблатта принимают тот прирост артериального давления, который вызывает введение крысам препарата, эквивалентного по действию 0,33 мкг ангиотензина II (СІВА). Особенно резко увеличивается содержание ангиотензиногена в препарате на последнем этапе очистки (получение осадка), когда удаляются ангиотенгиназы (рис. 11).

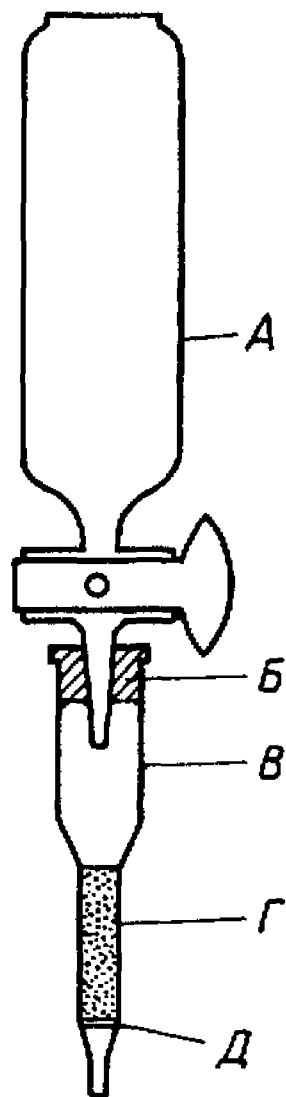


Рис. 10. Реактор-колонка.

А — воронка для элюирующего раствора; Б — шлиф колонки; В — верхняя часть колонки (высота 3 см, диаметр 15 мм); Г — нижняя часть колонки (высота 3 см, диаметр 5 мм), заполненная смолой Дауэкс 50Х2; Д — фильтр.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЛИКРЕИНА И КАЛЛИКРЕИНОГЕНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Т. С. ПАСХИНА, А. В. КРИНСКАЯ

Калликреины плазмы крови (КФ 3.4.4.21), трипсиноподобные «сериновые»* протеиназы узкой субстратной специфичности, катализируют в организме кининогеназ-

* Относятся к группе протеолитических ферментов, в активный центр которых входит остаток серина.

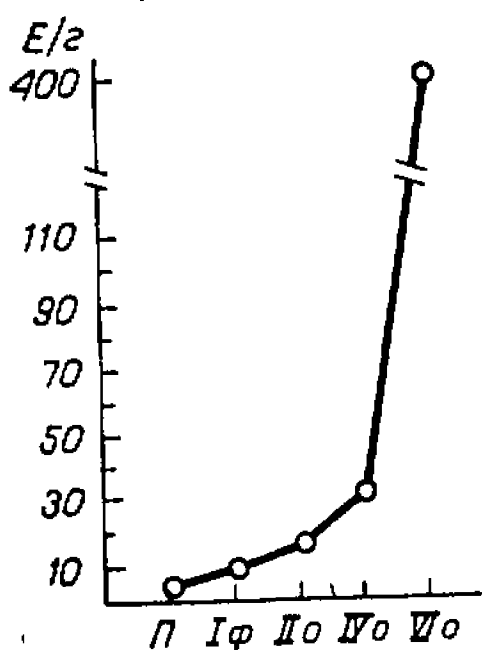


Рис. 11. Содержание ангиотензиногена в препаратах на различных этапах очистки (в единицах Гольдблатта — Е — на 1 г препарата).

П — белковая паста; Iф — фильтрат I; IIо, IVо и VIо — осадки, получаемые при последовательном высаливании белков сульфатом аммония (объяснение в тексте).

На ординате — активность ангиотензиногена, Е/г; на абсциссе — обозначения фракций.

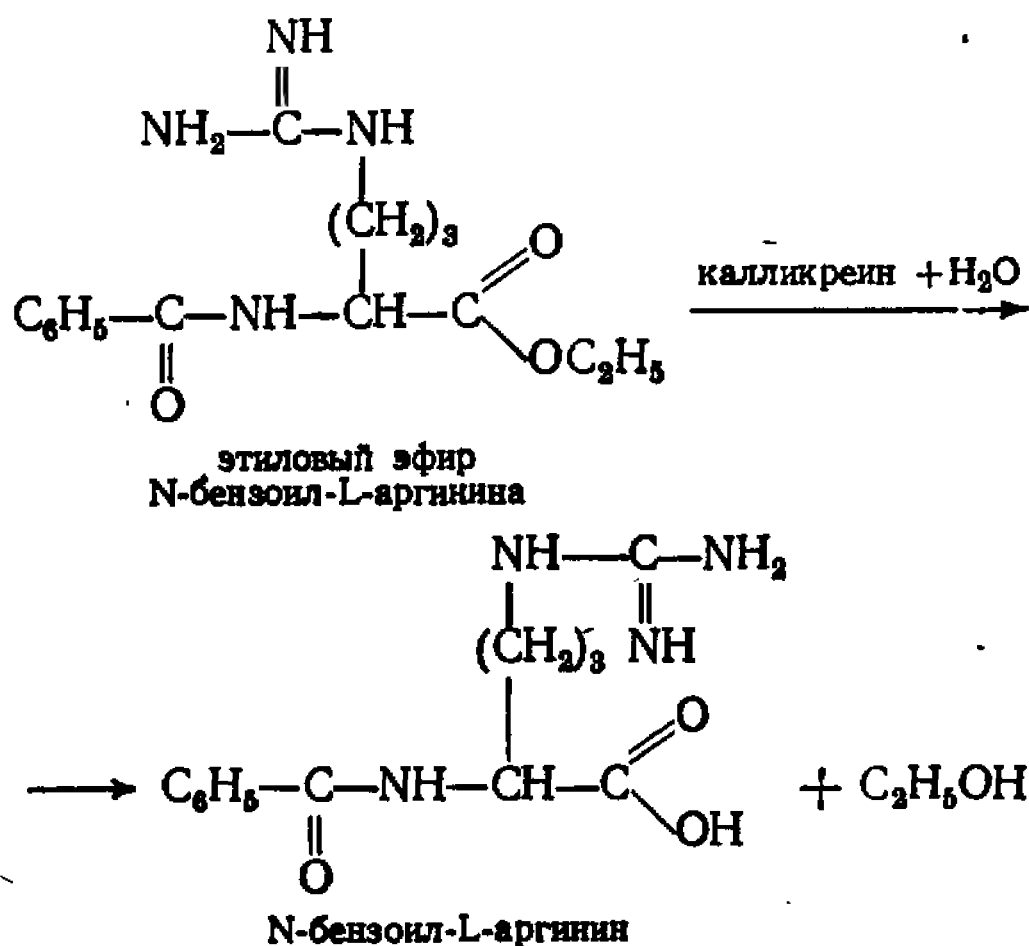
значительные трудности. Одним из способов оценки состояния кининовой системы является определение активности калликреина и содержания калликреиногена в сыворотке крови.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ранее одним из нас (Т. С. Пасхина, Г. А. Яровая, 1970; Т. С. Пасхина и др., 1973) для определения калликреина и его предшественника был предложен метод хроматографии на колонке. В основу метода положены «катионные» свойства калликреина, в силу чего он не сорбируется при рН 7,0 и низкой ионной силе на ДЭАЭ-сефадексе А-50 и может быть определен в неадсорбированной фракции сыворотки крови спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза эфир-

ную реакцию, т. е. отщепление нонапептида брадикинина или его N-концевых гомологов от неактивного предшественника гликопротеидной природы — кининогена. Эта реакция лежит в основе образования свободных кининов в циркулирующей крови, перикапиллярных пространствах, секреторных железах, почках и некоторых других органах и определяет в организме ряд важных физиологических функций, таких, как регуляция микроциркуляции, регионарного кровообращения, уровня кровяного давления и т. д. (Т. С. Пасхина, 1966, 1972). Активирование кининогеназ и образование свободных кининов наблюдаются при ряде физиологических (становление дыхания у новорожденных и др.) и патологических состояний, таких, как воспаление (в том числе панкреатиты различного происхождения, артриты), бронхиальная астма и др. Однако прямой контроль за скоростью кининообразования в организме представляет

ной связи в этиловом эфире N-бензоил-L-аргинина по схеме:



Ниже описан упрощенный «пробирочный» вариант метода, не требующий хроматографической колонки и позволяющий использовать 0,25 мл сыворотки вместо 1 мл. Внесены необходимые изменения в методику получения фракции, содержащей калликреин и его предшественник, что оказалось особенно важным при проведении анализа с образцами сыворотки крови, полученной от больных.

РЕАКТИВЫ И ПРЕПАРАТЫ

ДЭАЭ-сефадекс А-50 («Pharmacia», Швеция) или ДЭАЭ-молселект А-50 («Реанал», Венгрия).

Трипсин, очищенный препарат («Спофа», Чехословакия) с удельной активностью 16—18 Е.

Овомукоид (Олайнинский завод хим. реактивов).

Трипсин-сефазим («Pharmacia», Швеция) или лабораторный препарат иммобилизованного трипсина.

Гидрохлорид этилового эфира N-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ·HCl) (Московский завод им. Войкова).

Густую суспензию ДЭАЭ-сефадекса А-50, уравновешенную 0,02 М фосфатным буфером (рН 7,0), готовят в соответствии с прописью фирмы: 10 г сухого сефадекса оставляют в дистиллированной воде на 24 ч для набухания при комнатной температуре, затем сефадекс пе-

реносят на воронку Бюхнера и промывают 0,02 М фосфатным буфером (рН 7,0), 10 г сухого сефадекса достаточно для проведения 100 анализов.

0,02 М фосфатный буфер (рН 7,0).

0,02 М фосфатный буфер (рН 7,0), содержащий 0,05 М NaCl.

0,1 М фосфатный буфер (рН 8,0).

0,1 % раствор трипсина в 0,002 н. растворе HCl.

2 % раствор овомукоида в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,0).

1,5 mM раствор БАЭЭ в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,0); 6,2 мг БАЭЭ растворяют в 12 мл 0,1 М фосфатного буфера.

ХОД АНАЛИЗА

Определение калликреина и калликреиногена включает два основных этапа: первый — получение при рН 7,0 неадсорбированной на ДЭАЭ-сефадексе А-50 фракции белков сыворотки крови, второй — собственно измерение активности калликреина и калликреиногена в фильтрате спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза БАЭЭ (Т. С. Пасхина и др., 1968). На результаты анализа оказывают влияние условия взятия и хранения крови, поэтому кровь спускают через силиконизированную иглу в полиэтиленовую или силиконизированную пробирку; при получении плазмы смешивают 9 объемов крови и 1 объем 4 % раствора цитрата натрия и центрифугируют 15 мин при 1500 g.

Получение неадсорбированной фракции

0,25 мл сыворотки (плазмы) крови разводят в 3 раза 0,02 М фосфатным буфером (рН 7,0) и добавляют к 3 мл густой суспензии ДЭАЭ-сефадекса А-50, уравновешенного тем же буфером. Смесь осторожно перемешивают в течение 10 мин тонкой стеклянной палочкой, затем добавляют 3 мл 0,02 М фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 0,05 М NaCl, перемешивают еще 2 мин и переносят суспензию на стеклянный фильтр № 1 (ДГ-29) и фильтруют при пониженном давлении.

Фильтрат количественно переносят в мерную пробирку на 50 мл и доводят до метки 0,02 М фосфатным буфером.

Определение активности калликреина

Из 5 мл фильтрата берут 1 мл, добавляют 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,0) и 1 мл 1,5 мМ раствора БАЭЭ; в контрольную пробу вносят 2 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,0) и 1 мл 1,5 мМ раствора БАЭЭ (проба на спонтанный гидролиз эфира при рН 8,0). В пробах измеряют на спектрофотометре прирост оптической плотности при 253 нм и 25 °С против контрольной пробы в течение 15 мин ($\Delta D_{253}^{15 \text{ мин}}$). Отсчеты делают через каждые 5 мин.

Определение содержания калликреиногена

Берут 1 мл фильтрата, добавляют 0,8 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,0) и 0,1 мл 0,1 % раствора трипсина в 0,002 н. растворе НСl; пробу выдерживают 2 мин при 25 °С, после чего добавляют 0,1 мл 2 % раствора овомукоида в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,0) для инаktivирования трипсина. Через 15 мин к пробе добавляют 1 мл 1,5 мМ раствора БАЭЭ; эстеразную активность пробы измеряют спектрофотометрически по приросту оптической плотности при 253 нм в течение 10—15 мин, делая отсчеты через 3—5 мин.

Активирование калликреиногена можно осуществить и связанным трипсином — трипсин-сефазимом («Фармация», Швеция) или иммобилизованным трипсином, полученным в лабораторных условиях (см. В. Ф. Нарткова и др., с. 192). К 1 мл фильтрата добавляют 0,3—0,5 мл густой суспензии сефазим-трипсина (3—3,5 Е) в 1 мМ ацетатном буфере (рН 4,2) и 0,7—0,5 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,0), осторожно перемешивают и оставляют на 20 мин при 25 °С. Через 20 мин сефазим удаляют центрифугированием или фильтрованием на стеклянном фильтре № 1, к пробе добавляют 1 мл 1,5 мМ раствора БАЭЭ и скорость гидролиза эфира измеряют при 253 нм, как указано выше.

Результаты изучения ферментных свойств и биологической активности неадсорбированной на ДЭАЭ-сефадексе фракции (полученной по данной прописи) после ее обработки трипсином подтвердили данные (Т. С. Пасхина и др., 1973) о том, что аргинин-эстеразная активность фракции обусловлена калликреином. Спектр ингибиторов активированной неадсорбированной фракции

соответствует таковому для очищенного препарата калликреина.

Расчет активности

За единицу активности (Е) принимают то количество калликреина, которое, катализируя эстеролитический распад БАЭЭ в стандартных условиях, освобождает 1 мкмоль бензоил-аргинина за 1 мин. Содержание калликреина и калликреиногена выражают числом мЕ в 1 мл сыворотки крови и вычисляют по формуле:

$$\frac{\Delta D_{253}^{15 \text{ мин}} \cdot 3 \cdot 5 \cdot 1000}{15 \cdot 1,1 \cdot 0,25} = \Delta D_{253}^{15 \text{ мин}} \cdot 3636 =$$

= число мЕ калликреина в 1 мл сыворотки крови,

где 1,1 — прирост оптической плотности при 253 нм, соответствующий образованию 1 мкмоль бензоил-аргинина в 1 мл пробы; 3 — объем пробы в кювете (мл); 5 — объем фильтрата (мл); 0,25 — количество сыворотки крови, взятой для анализа (мл); 15 — время протекания реакции (мин).

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА

Используя данный метод, мы нашли, что свободный калликреин практически отсутствует в сыворотке крови здоровых лиц, что, по-видимому, обусловлено наличием в ней активных ингибиторов этого фермента. Колебания активности калликреина в сыворотке крови здоровых лиц от 0 до 10 мЕ/мл ($\Delta D_{253}^{15 \text{ мин}} = 0,001—0,003$) лежат в пределах ошибки метода; достоверные величины получены только при некоторых патологических состояниях (Т. С. Пасхина и др., 1972)*. Содержание калликреиногена в сыворотке крови здоровых лиц равно $369 \pm \pm 59$ мЕ/мл, в цитратной плазме — 318 ± 57 мЕ/мл. Содержание калликреиногена снижено в сыворотке крови лиц с заболеваниями печени (циррозы, жировая дистрофия, гепатиты) на 20—60% (Т. С. Пасхина и др., 1974)*, что подтверждает имевшиеся ранее наблюдения о синтезе калликреиногена в печени (Wang e. a., 1972). Снижение содержания калликреиногена найдено также при ожоговом шоке; повышение содержания калликреиногена, обнаруженное при нефротическом синдроме ($464 \pm \pm 84$ мЕ/мл) позволяет предполагать усиление белоксин-

тезирующей функции печени при данном заболевании в ответ на значительную экскрецию белков крови с мочой.

ПОЛУЧЕНИЕ ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА КАЛЛИКРЕИНА ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

А. В. КРИНСКАЯ, Т. С. ПАСХИНА

В плазме крови калликреин (КФ 3.4.4.21, подробнее об этой группе ферментов см. с. 157) присутствует в виде неактивного предшественника, которому свойственна микрогетерогенность. Рядом авторов были получены частично очищенные препараты калликреина из сыворотки крови человека (А. Л. Лауфер и др., 1969; Colman e. a., 1969, и др.). Низкое содержание в плазме крови, микрогетерогенность, высокая лабильность и легкость комплексования с другими белками являются основными причинами, осложняющими получение высокоочищенных препаратов калликреинов плазмы.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод базируется на основных свойствах калликреина плазмы крови ($pH_1 \sim 8,5$), благодаря которым он не сорбируется на ДЭАЭ-сефадексе А-50 при pH 7,0 и низкой ионной силе и прочно связывается с СЭ-сефадексом К-50, что позволяет отделить его от других трипсиноподобных протеиназ сыворотки крови и сопутствующей БАЭЭ-эстеразы, не являющейся кининогеназой. Следующий этап, гельфильтрация через сефадекс G-200, позволяет отделить собственно калликреин от его малоактивных высокомолекулярных комплексов.

Полученные препараты калликреина обладают гипотензивным, кининогеназным и аргинин-эстеразным действием. Два последних свойства положены в основу методов определения калликреина.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАЭЭ-ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КАЛЛИКРЕИНА

БАЭЭ-эстеразную активность калликреина измеряют модифицированным методом Траутшольда и Верле (Trautschold, Werle, 1961; Т. С. Пасхина и др., 1968),

основанном на спектрофотометрическом измерении скорости отщепления бензоил-аргинина (БА) от этилового эфира N-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ) (см. Т. С. Пасхина, А. В. Кринская, с. 157).

Реактивы

0,05 М трис-HCl буфер (рН 8,0).

1,5 мМ раствор БАЭЭ·HCl (6,2 мг БАЭЭ·HCl растворяют в 12 мл буфера, рН 8,0). Раствор готовят в день измерения активности фермента.

Ход анализа

К 1 мл раствора БАЭЭ добавляют раствор фермента (100—150 мЕ в 0,1—0,3 мл) и доводят объем пробы до 3 мл 0,05 М трис-HCl буфером (рН 8,0). Реакцию проводят в термостатированной (25°C) кювете спектрофотометра, регистрируя прирост оптической плотности при 253 нм, с интервалом в 1—5 мин в зависимости от активности фермента против контрольной пробы на спонтанный гидролиз БАЭЭ. Активность фермента вычисляют по приросту оптической плотности в пробе за 1 мин по формуле:

$$\frac{\Delta D_{253}^{1 \text{ мин}} \cdot 3}{1,1} = \Delta D_{253}^{1 \text{ мин}} \cdot 2,73 = \text{количество Е* на пробу,}$$

где $\Delta D_{253}^{1 \text{ мин}}$ — прирост оптической плотности при 253 нм за 1 мин в 1 мл пробы; 3 — объем пробы в кювете (мл); 1,1 — прирост оптической плотности при 253 нм, соответствующий образованию 1 мкмоля БА из БАЭЭ в 1 мл пробы.

Удельную активность фермента в Е/мг рассчитывают по формуле:

$$\frac{\Delta D_{253}^{1 \text{ мин}} \cdot 2,73}{C},$$

где С — количество белка в пробе в мг.

Исходная БАЭЭ-эстеразная активность сыворотки крови измеряется следующим образом: 0,03 мл сыворот-

* Е — международная единица активности фермента, соответствующая расщеплению 1 мкмоля субстрата в 1 мин в стандартных условиях.

ки разводят до 2 мл 0,05 М трис-НСl буфером (рН 8,0) и добавляют 1 мл 1,5 мМ БАЭЭ. Измерения БАЭЭ-эстеразной активности проводят, как описано выше, в течение 30 мин, делая отсчеты через каждые 5 мин. Расчет активности в Е/мл сыворотки проводят по формуле:

$$\frac{\Delta D_{253}^{30 \text{ мин}} \cdot 3}{1,1 \cdot 0,03 \cdot 30} = \Delta D_{253}^{30 \text{ мин}} \cdot 3,03,$$

где $\Delta D_{253}^{30 \text{ мин}}$ — прирост оптической плотности при 253 нм за 30 мин в 1 мл пробы; 3 — объем пробы (в мл); 0,03 — количество сыворотки, взятой для анализа (мл); 1,1 — прирост оптической плотности при 253 нм, соответствующий образованию 1 мкмоль БА из БАЭЭ в 1 мл пробы; 30 — время протекания реакции (мин).

Сыворотку разводят непосредственно перед измерением БАЭЭ-эстеразной активности калликреина для предотвращения активирования БАЭЭ-эстераз сыворотки при разбавлении.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНИНОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ КАЛЛИКРЕИНА

Кининогеназная активность очищенных препаратов калликреина измеряется по количеству брадикинина, отщепленному от кининогена после 1-, 2- и 5-минутной инкубации с калликреином. В качестве кининогена используют прогретую при 61 °С и диализованную против 0,9% раствора NaCl сыворотку крови морской свинки.

Реактивы

Раствор брадикинин-триацетата с концентрацией 200 нг в 1 мл 0,004 н. раствора щавелевой кислоты готовят следующим образом (Т. С. Пасхина и др., 1968)*: 1 мг брадикинин-триацетата тщательно растирают в ступке с 99 мг NaCl. 1 мг этого препарата (10 мкг брадикинина) растворяют в 50 мл 0,004 н. раствора щавелевой кислоты; последняя уменьшает адсорбцию брадикинина на стекле. Растворы брадикинина хранят в замороженном виде при —20 °С.

0,1 М трис-НСl буфер (рН 7,6), содержащий 1 мМ 8-оксихинолин.

10% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Прогретая сыворотка крови морской свинки (источник кининогена): сыворотку прогревают 1 ч при 61°C на водяной бане и диализуют в течение 24 ч против 0,9% раствора NaCl.

Ход анализа

К 1 мл прогретой сыворотки крови морской свинки добавляют 1 мл раствора калликреина и 1 мл 0,1 М трис-HCl буфера (pH 7,6), содержащего 8-оксихинолин в качестве ингибитора киназазы, и инкубируют при 37°C. Пробы по 0,06 мл отбирают через 1, 2 и 5 мин и переносят в пробирки, содержащие 0,4 мл 10% раствора ТХУ; затем пробы нейтрализуют добавлением ~0,55 мл 0,5 н. раствора NaOH и объем проб доводят до 2 мл 0,004 н. раствором щавелевой кислоты. Содержание брадикинина в пробах определяют биологическим методом по сокращению изолированного рога матки крыс (Т. С. Пасхина и др., 1968)*.

АКТИВИРОВАНИЕ ПРЕКАЛЛИКРЕИНА (КАЛЛИКРЕИНОГЕНА)

Калликреин присутствует в сыворотке крови в виде неактивного предшественника — калликреиногена, поэтому для определения его ферментативной активности на первой стадии очистки требуется предварительное активирование трипсином.

Реактивы

0,1% раствор трипсина в 0,002 н. растворе HCl (кристаллический трипсин «Спофа», Чехословакия, удельная активность 16—20 Е/мг по расщеплению БАЭЭ).

2% раствор овомукоида (Олайнинский завод хим. реактивов) в 0,05 трис-HCl буфере (pH 8,0).

Ход анализа

К 1 мл раствора испытуемого образца, содержащего прекалликреин, добавляют 0,8 мл 0,05 М трис-HCl буфера (pH 8,0) и 0,1 мл раствора трипсина в 0,002 н. растворе HCl. Пробу выдерживают 2 мин при 25°C и добавляют 0,1 мл раствора овомукоида для подавления активности трипсина. Через 15 мин приступают к определению БАЭЭ-эстеразной и кининогеназной активности калликреина, как это описано выше.

ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА КАЛЛИКРЕИНА

Для выделения калликреина используют смешанную сыворотку крови доноров с группами крови А, В, АВ и 0.

I этап. Получение сыворотки крови. Кровь доноров собирают в сухую посуду и образовавшийся сгусток удаляют центрифугированием в течение 30 мин при 1500 g.

II этап. Цельную сыворотку крови человека разбавляют в три раза 0,02 М фосфатным буфером (рН 7,0) и наносят на колонку (5×40 см) с ДЭАЭ-сефадексом А-50, уравновешенным тем же буфером. Колонку промывают 0,02 М фосфатным буфером (рН 7,0) и собирают неадсорбированную фракцию, содержащую калликреиноген и балластные белки, преимущественно γ -глобулины. Скорость тока буфера — 150 мл/ч; объем фракции — 200 мл. Во фракциях определяют концентрацию белка по поглощению при 280 нм, а также после активирования калликреиногена БАЭЭ-эстеразную и кининогеназную активности (рис. 12, а). Фракции, содержащие калликреиноген, объединяют, осаждают $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 0,5 насыщения. Осадок белка растворяют в минимальном объеме 0,02 М фосфатного буфера (рН 6,4) и освобождают от $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным 0,02 М фосфатным буфером (рН 6,4); элюцию осуществляют тем же буфером.

III этап. Активную фракцию белка, полученную на предыдущем этапе, наносят на колонку 1,5×30 см, заполненную СЭ-сефадексом К-50, уравновешенным 0,02 М фосфатным буфером (рН 6,4). После впитывания белкового раствора колонку промывают 200—250 мл исходного буфера для удаления неадсорбированных белков. Десорбцию белков осуществляют двойным градиентом рН и ионной силы, который создают с помощью двух сосудов равного сечения: в смесителе — 150 мл 0,02 М фосфатного буфера (рН 6,4); в питающем сосуде — 150 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,0), содержащего 0,3 М NaCl. Скорость протекания буфера — 10 мл/ч; объем фракции — 10 мл. В каждой фракции определяют БАЭЭ-эстеразную и кининогеназную активности (см. рис. 12, б). Эстеразная активность может быть найдена во всех фракциях, кининогеназная — обнаруживается лишь во фракциях, элюируемых с колонки при рН ~6,9 и концентрации NaCl ~0,2 М. Фракции, обладающие

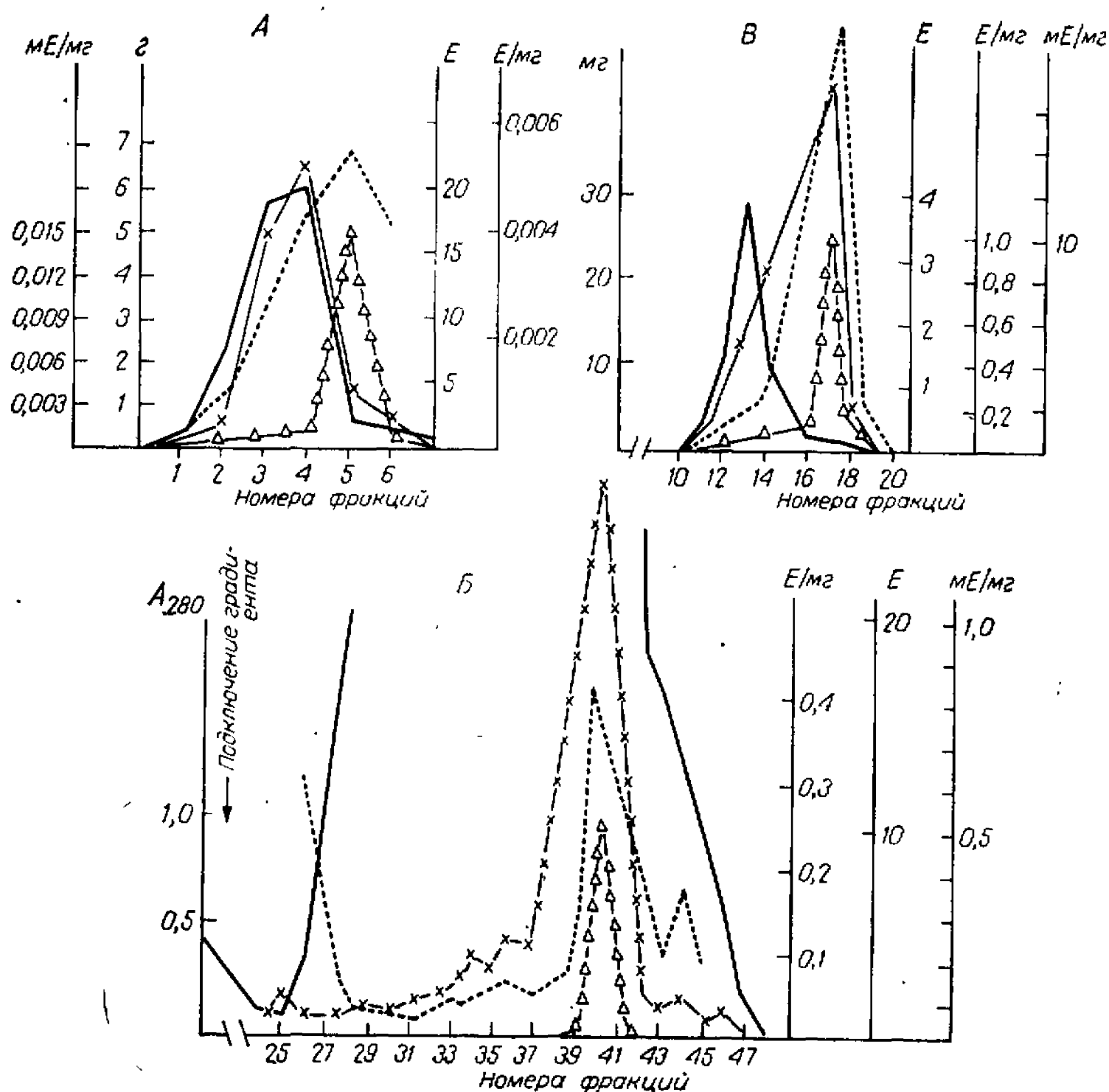


Рис. 12. Основные этапы получения высокоочищенного препарата калликреина из сыворотки крови человека. Условия опытов описаны в тексте.

А — негативная сорбция разбавленной сыворотки крови на ДЭАЭ-сефадексе А-50 при pH 7,0 (объем фракции 200 мл); Б — хроматография калликреинсодержащих фракций на СЭ-сефадексе К-50, получение элюата при pH 6,9 и 0,2 М NaCl (объем фракции 10 мл); В — гельфильтрация калликреина на сефадексе G-200 (объем фракции 2 мл).

На ординате — БАЭЭ-эстеразная активность в Е (тире — крестик), удельная БАЭЭ-эстеразная активность в Е/мг (прерывистая линия), удельная кининогеназная активность в мЕ/мг (тире — треугольник), а также содержание белка (сплошная линия) в г (А) в оптической плотности при 280 нм, A_{280} (Б) и в миллиграммах (В); на абсциссе — фракции по номерам.

кининогеназной активностью, объединяют, диализуют против дистиллированной воды и лиофилизируют.

IV этап. Лиофилизированный препарат калликреина, полученный на III этапе, растворяют в 1 мл 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,0), содержащего 0,2 М NaCl, и наносят на колонку 1×100 см, заполненную сефадексом G-200, уравновешенным тем же буфером. После впи-

тивания белка колонку промывают 0,05 М фосфатным буфером (рН 7,0) с 0,2 М NaCl со скоростью 5 мл/ч; объем фракции — 2 мл. Фракции с максимальной БАЭЭ-эстеразной и кининогеназной активностями, соответствующие правому плечу белкового пика на элюционной кривой (см. рис. 12, В) ($V_e = 34-35$ мл, V_0 колонки = 25 мл), собирают, диализуют 3 ч против дистиллированной воды и лиофилизируют. Менее активные фракции ($V_e = 28-33$ и $36-37$ мл), представляющие, по-видимому, комплексы калликреина с другими белками, подвергают дополнительной очистке.

Результаты одного из типичных опытов по очистке калликреина из сыворотки крови человека представлены в табл. 20.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТОВ КАЛЛИКРЕИНА

Полученные препараты калликреина при электрофорезе в полиакриламидном геле образуют одну полосу в области γ -глобулинов. Относительная молекулярная масса очищенного калликреина, рассчитанная по данным гельфилтрации на сефадексе G-200, равна примерно 100 000. Препараты не обладают фибринолитической и казеинолитической активностями, не превращают фибриноген в фибрин, фактически не имеют амидазной активности и не расщепляют эфиров лизина. Высокоочищенные препараты калликреина не содержат ингибиторов и активаторов калликреина, тормозятся диизопропилфторфосфатом, 10^{-4} М, трасилолом ($K_i = 1 \cdot 10^{-10}$ М), ингибитором трипсина из бобов сои ($K_i = 1 \cdot 10^{-10}$ М) (Т. С. Пасхина и др., 1975). Овомукоид, гепарин, термо- и кислотостабильный ингибитор трипсина из сыворотки крови кролика (В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина, 1969) не тормозят кининогеназную и эстеразную активности препарата. Кининогеназная активность препарата, рассчитанная на единицу БАЭЭ-эстеразной активности, на два порядка выше таковой для трипсина. Лиофилизированные препараты калликреина содержат около 80% белка (по Лоури) и до 20% активного фермента (по данным титрования трасилолом) и сохраняют свою активность при 4 °С в течение нескольких месяцев.

Полученные препараты калликреина «функционально» чисты и могут быть использованы для изучения механизма кининогеназной реакции в модельных исследо-

Очистка препарата калликреина

Этапы очистки	Характеристика			
	объем, мл	белок, г	БАЭЭ-эстеразная активность	
			общая, Е	удельная Е/мг
I. Сыворотка крови	200	15,25	46	0,003
II. Негативная сорбция на ДЭАЭ-сефадексе А-50 (рН 7,0)	1200	2,0	40	0,02
III. Сорбция на СЭ-сефа- дексе К-50 (элюат ~0,2 М NaCl, рН ~6,9)	10	0,065	26	0,4
IV. Гельфильтрация на се- фадексе G-200				
V ₀ =28—33 мл	6	0,018	12,08	0,67
V ₀ =34—35 мл	2	0,002	4,0	2,0
V ₀ =36—37 мл	2	0,001	0,8	0,8

* мЕ кининогеназной активности соответствует количеству фер-
(1 нмоль) брадикинина или 1,198 мкг (1 нмоль) каллидина (Traut-

** Величина активности занижена из-за присутствия балластных

ваниях с очищенным субстратом, а также для изучения
связи кининовой системы с системой свертывания крови
и фибринолиза как *in vitro*, так и *in vivo*.

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКООЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА КИНИНОГЕНА ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРОЛИКА

Т. П. ЕГОРОВА, Л. Г. МАКЕВНИНА,
Е. Б. РОССИНСКАЯ, Т. С. ПАСХИНА

Кининоген, неактивный предшественник вазоактив-
ных пептидов — кининов, присутствует в плазме крови
человека и млекопитающих в количестве 20—30 мг в
100 мл, является кислым α_1 -гликопротеидом с высоким
содержанием углеводов; относительная молекулярная

из сыворотки крови человека

фракций		Степень очистки		Выход в % от общей активности		Отношение кининогеназной и БАЭЭ-эстеразной активностей $\times 10^{-3}$
кининогеназная активность		по кининогеназной активности	по БАЭЭ-эстеразной активности	по кининогеназной активности	по БАЭЭ-эстеразной активности	
общая, мЕ*	удельная мЕ/мг					
— (20**)	— 0,01	— 1	1 6,6	100	100 87	0,5
32,5	0,5	50	133	162	56	1,25
8 20 1,3	0,4 10,0 1,3	44 1000 130	233 666 266	40 100 6,5	26 9 1,7	0,6 5,0 1,5

мента, освобождающего за 1 мин в стандартных условиях 1,068 мкг schold, Werle, 1970).

белков, мешающих определению

масса этого белка равна 50 000. В плазме крови кининоген может присутствовать в нескольких молекулярных формах, в том числе (5—15% у различных видов) в виде высокомолекулярного кининогена (ВМК) с относительной молекулярной массой 100 000—200 000 (Т. С. Пасхйна, 1972).

Кининоген служит субстратом для специфических (калликреины) и неспецифических (трипсин) протеиназ, которые отщепляют от него нонапептид — брадикинин или декапептид — каллидин. На рис. 13 схематически изображены предполагаемая структура кининогена и положение расщепляемых связей. Калликреин плазмы крови и трипсин отщепляют от кининогена брадикинин, панкреатический калликреин — каллидин.

Получение высокоочищенного препарата кининогена необходимо для изучения механизма кининогеназной реакции. Выделение кининогена представляет трудную

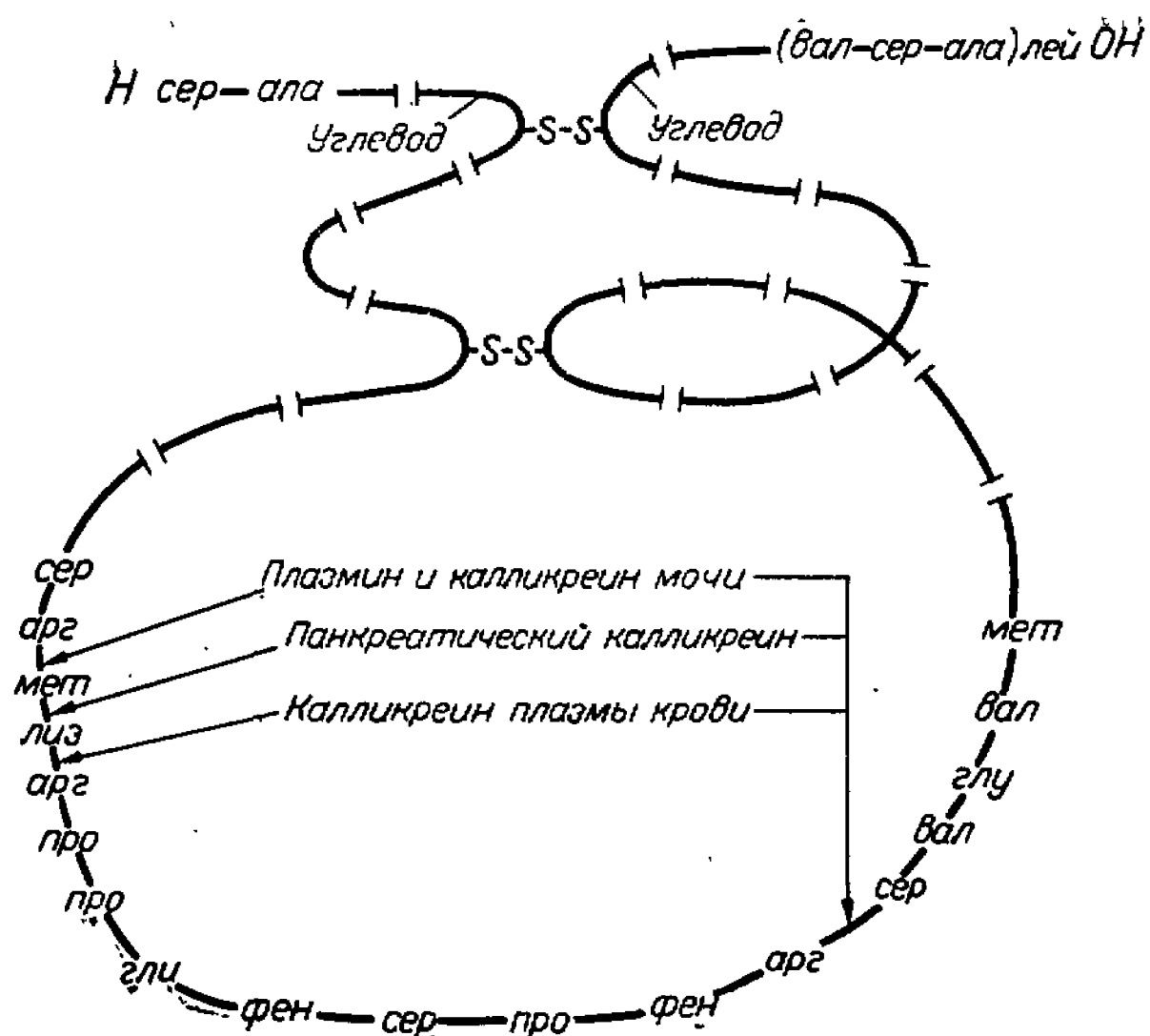


Рис. 13. Схема предполагаемой структуры кининогена быка (Ямафудзи, Идзумия, 1971). Стрелками указаны связи, расщепляемые соответствующими кининогеназами.

задачу из-за низкого содержания этого белка в плазме крови и возможности его расщепления калликреинами плазмы крови в процессе выделения.

Опубликовано несколько методов выделения кининогена, в том числе из плазмы крови человека и быка (Набергманн, 1970). Ниже описан метод выделения кининогена из плазмы крови кролика, представляющий улучшенный вариант метода, предложенного ранее (Т. С. Пасхина, Т. П. Егорова, 1966).

Метод основан на способности кининогена как белка с низкой изоэлектрической точкой, pH_i 3,15—3,5 (Т. Л. Егорова, Т. С. Пасхина, 1967), избирательно связываться с ДЭАЭ-сефадексом А-50 при pH 7,2 и высокой ионной силе. Отделение кининогена от других кислых белков осуществляли путем адсорбционной хроматографии на гидроксилпатите, а затем гельфильтрации на сефадексе G-200; максимальная очистка достигнута применением в качестве последнего этапа препаративного электрофореза в полиакриламидном геле.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КИНИНОГЕНА

Содержание кининогена в плазме крови и во фракциях на отдельных этапах его выделения определяют по количеству брадикинина, образовавшегося после обработки исследуемой плазмы или фракции трипсином, и выражают в условных единицах (Е); одна единица соответствует отщеплению 1 мкг брадикинина. Для инактивации кининазы и ингибитора трипсина плазму прогревают в кислой среде.

Реактивы

0,1 М трис-HCl буфер (pH 7,6), содержащий 3 мМ 8-оксихинолин; 4,3 мг 8-оксихинолина растворяют в 10 мл 0,1 М трис-HCl буфера (pH 7,8).

0,1% раствор трипсина в 0,25 мМ растворе HCl; используют препараты трипсина, не содержащие химо-трипсин.

0,2 мМ раствор брадикинина в 4 мМ щавелевой кислоте; 10 мкг брадикинина (синтетического) растворяют в 50 мл кислоты.

Ход определения

0,1 мл плазмы крови добавляют к 1 мл 0,2% раствора уксусной кислоты и нагревают 30 мин на кипящей водяной бане; пробы охлаждают, нейтрализуют 0,5 н. раствором NaOH до pH 7,2—7,4 (сине-зеленая окраска по бромтимоловому синему), переносят количественно в полиэтиленовые пробирки, добавляют 1 мл 0,1 М трис-HCl буфера (pH 7,6), 0,2 мл раствора трипсина (200 мкг) и инкубируют 30 мин при 37 °С. Кининогеназную реакцию прекращают добавлением раствора 0,5 мл 20% раствора ТХУ, центрифугируют, центрифугат нейтрализуют 0,5 н. раствором NaOH до pH 7,0, доводят объем до 5 мл в мерной пробирке 4 мМ раствором щавелевой кислоты и определяют в нем содержание брадикинина биологическим методом на изолированном роге матки крысы, детально описанным ранее (Т. С. Пасхина и др., 1968)*.

Определение кининогена в белковых фракциях на различных этапах очистки проводят без денатурации белка. К 0,2 мл фракции, отобранной в полиэтиленовые

пробирки, добавляют 0,6 мл 0,1 М трис-НСl буфера (рН 7,6), содержащего 3 мМ 8-оксихининолин (ингибитор карбоксипептидазы N) и 0,2 мл раствора трипсина (100—200 мкг) в 0,25 мМ растворе НСl. Пробы инкубируют 20 мин при 37 °С, реакцию останавливают добавлением 0,2 мл 20% раствора ТХУ; через 15 мин пробы нейтрализуют 0,5 н. раствором NaOH (0,65—0,67 мл), объем доводят до 2 мл 4 мМ щавелевой кислотой и определяют содержание брадикинина биологическим методом; результаты выражают в Е/мг белка.

ВЫДЕЛЕНИЕ КИНИНОГЕНА

Реактивы

0,01 М Na-фосфатный буфер (рН 7,2—7,4), содержащий 0,12 М NaCl.

0,01, 0,1 и 0,5 М Na-фосфатные буферные растворы (рН 6,8), содержащие 0,1 М NaCl.

Гидроксилapatит, синтезированный по Тизелиусу (Tiselius e. a., 1956).

Свежая слюна человека, отцентрифугированная при 2000 g в течение 20 мин.

1 М триэтиламинобикарбонатный буфер (рН 8,0) готовят пропусканием CO₂ в 1 М водный раствор триэтиламина до достижения рН 8,0. Перед опытом разбавляют до необходимой концентрации.

Ход выделения

1 - й этап. Получение плазмы крови

Кровь из сонной артерии кроликов спускают в мерный полиэтиленовый сосуд, содержащий 4% раствор цитрата натрия (1 объем на 10 объемов крови); центрифугируют 20 мин при 1500 g, плазму отделяют от форменных элементов путем отсасывания ее шприцем с полиэтиленовым наконечником.

2 - й этап. Сорбция кининогена на ДЭАЭ-сефадексе А-50

400 мл плазмы крови разбавляют в два раза 0,01 М Na-фосфатным буфером с 0,12 М NaCl (рН 7,2—7,4) и вносят в стакан, содержащий 400 мл густой суспензии

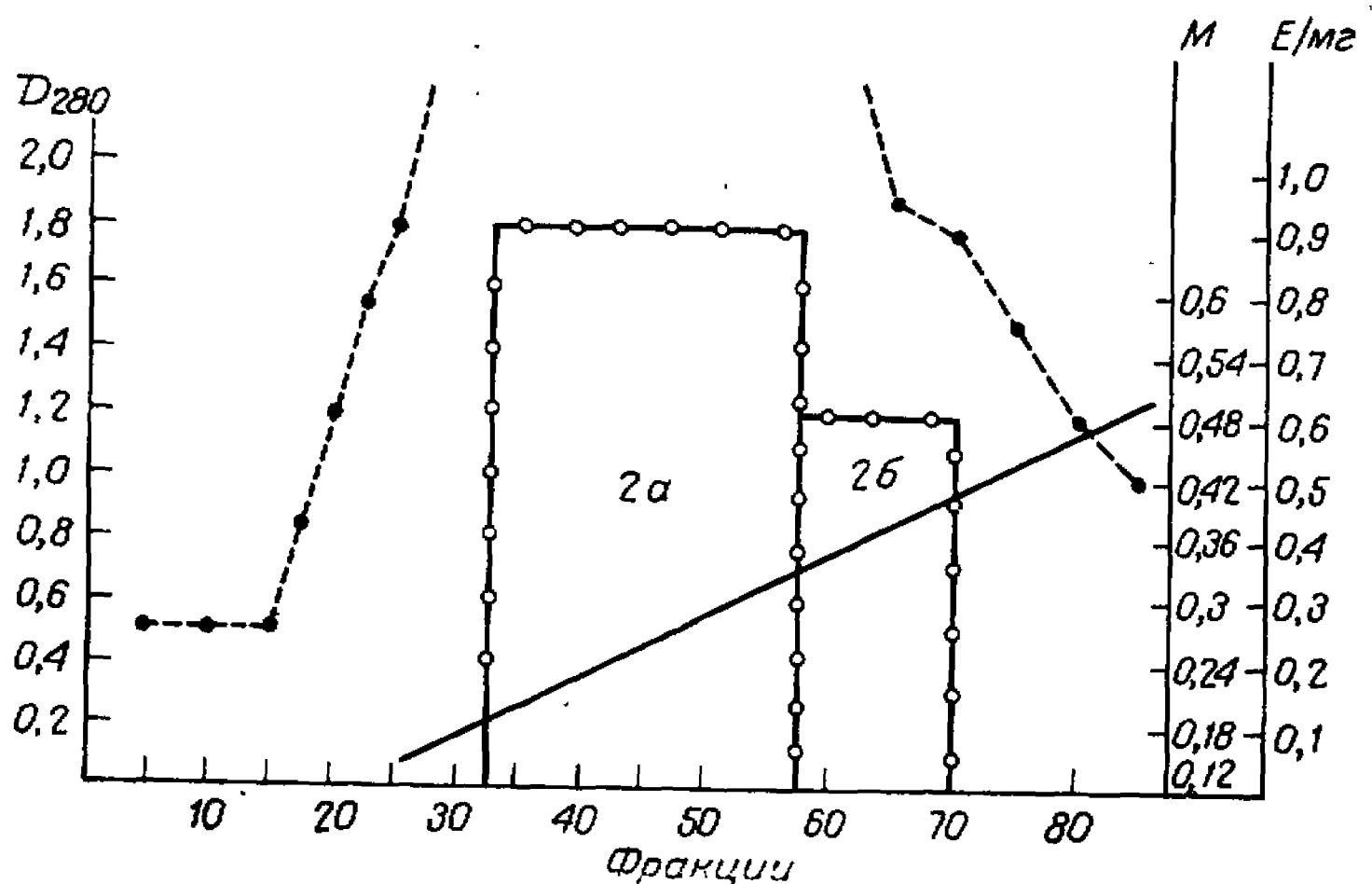


Рис. 14. Очистка кининогена на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50. Условия опыта см. в тексте (2-й этап очистки).

На ординате — содержание белка в единицах оптической плотности при 280 нм (прерывистая линия), молярная концентрация NaCl в молях (сплошная линия), содержание кининогена в Е/мг (точка — тире), на абсциссе — фракции (по номерам коллекторных пробирок), объем 8 мл.

ДЭАЭ-сефадекса А-50, уравновешенного тем же буфером. Смесь перемешивают магнитной мешалкой в течение 1 ч при комнатной температуре (18° — 20°C). 80—90% от вносимых на анионит белков плазмы крови не сорбируются в данных условиях. Их отсасывают на воронке Бюхнера, а анионит промывают 0,01 М Na-фосфатным буфером (рН 7,2—7,4), содержащим 0,12 М NaCl.

ДЭАЭ-сефадексы переносят в колонку размером $3,2 \times 55$ см. Белки десорбируют градиентной элюцией 0,01 М Na-фосфатным буфером (рН 7,2—7,4) с линейным изменением концентрации NaCl в буфере от 0,12 до 0,6 М; общий объем элюирующего буфера составляет 800 мл. Для полного снятия белков с геля через колонку пропускают еще 200—250 мл 0,01 М Na-фосфатного буфера, содержащего 0,6 М NaCl. Скорость тока буфера — 96 мл/ч; объем фракции — 8 мл.

Присутствие кининогена в полученных фракциях обнаруживают по реакции с калликреином слюны человека. Для этого к 0,05 мл элюата добавляют 0,1 мл слюны человека, смесь инкубируют 1 мин при комнатной температуре и вносят в баню с изолированным рогом

матки крысы; если в исследуемой фракции присутствует кининоген, то рог матки крысы будет сокращаться. В качестве контроля в баню с мышечным препаратом вносят смесь 0,05 мл буфера с 0,1 мл слюны.

Как видно на рис. 14, кининоген вытесняется из колонки при концентрации NaCl в буфере от 0,17 до 0,42 М (пробирки № 32—70); наибольшая концентрация кининогена наблюдается в пробирках № 32—58. Элюаты пробирок № 32—58 объединяют, белки осаждают $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при насыщении 0,65 и используют для дальнейшей очистки.

Во фракции 2б (см. рис. 14) содержится высокомолекулярный кининоген (ВМК), из которого калликреин плазмы крови человека отщепляет брадикинин; этот же фермент не образует кинины из фракции 2а.

Гельфильтрация на сефадексе G-25. Для дальнейшей очистки кининогена на гидроксилапатите осадок фракции 2а (см. рис. 14) собирают центрифугированием при 1500 g и растворяют в минимальном объеме 0,01 М Na-фосфатного буфера (рН 6,8), содержащего NaCl; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ удаляют из раствора, пропуская последний через колонку с сефадексом G-25 (размер колонки 2,5 × 25 см), уравновешенным тем же буфером. Раствор белка, не содержащий $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (отрицательная реакция с реактивом Несслера), используют для выделения кининогена.

3 - й этап. Адсорбция на гидроксилапатите

Гидроксилапатит уравновешивают 0,01 М Na-фосфатным буфером (рН 6,8), содержащим 0,1 М NaCl. Для опыта используют свежеприготовленный адсорбент, хранившийся не более 2 мес. Адсорбцию проводят в стакане.

Раствор белка, полученный в результате гельфильтрации через колонку с сефадексом G-25, вносят в стакан с 50 мл суспензии гидроксилапатита; смесь перемешивают мешалкой в течение 1 ч при комнатной температуре, центрифугируют при 5000 g в течение 20 мин. Осадок дважды промывают 40 мл буфера. Кининоген, адсорбированный на гидроксилапатите, элюируют 0,1 М Na-фосфатным буфером (рН 6,8), содержащим 0,1 М NaCl. Для этого к адсорбенту добавляют 50 мл буфера, перемешивают в течение 1 ч, гидроксилапатит отделяют

от раствора центрифугированием, дважды промывают его 40 мл буфера и промывные порции объединяют с первым элюатом.

В полученной фракции, обозначенной 3а в табл. 21, сконцентрировано 68% кининогена. Белки фракции осаждают $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 0,65 насыщения и используют для дальнейшей очистки.

4 - й этап. Гельхроматография на колонке с сефадексом G-200

Осадок белка, полученный на предыдущем этапе, отделяют от надосадочной жидкости центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин, растворяют в минимальном объеме (~ 12 мл) 0,01 M Na-фосфатного буфера (pH 6,8), содержащего 0,1 M NaCl, и вносят в колонку ($2,5 \times 50$ см) с сефадексом G-200, уравновешенным указанным буфером. Скорость тока буфера составляет 20 мл/ч; объем фракций — 3 мл.

Кининоген обнаруживают в пробирках с № 30 по № 75 (рис. 15). Наибольшая активность найдена в пробирках № 45—55. Элюаты объединяют соответственно содержанию в них кининогена в три фракции — 4а, 4б, 4в и белки осаждают $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 0,65 насыщения. Осадки собирают центрифугированием, растворяют в минимальном объеме дистиллированной воды, растворы обессоливают на колонке ($1,5 \times 25$ см) с сефадексом G-25, уравновешенным водой, и лиофилизируют.

5 - й этап. Препаративный электрофорез в полиакриламидном геле

Препарат кининогена, полученный из фракции 4б, неоднороден по белковому составу, хотя содержание примесей не превышает 25%; при диск-электрофорезе (7,5% полиакриламидный гель, трис-глициновый буфер, pH 8,9; Davis, 1964) обнаруживают, помимо кининогена с подвижностью α_1 -глобулина, белковые фракции в области альбумина, β_2 - и α_2 -глобулинов.

При некоторых биохимических исследованиях, в особенности для химической идентификации кининогена, необходим электрофоретически гомогенный препарат, со-

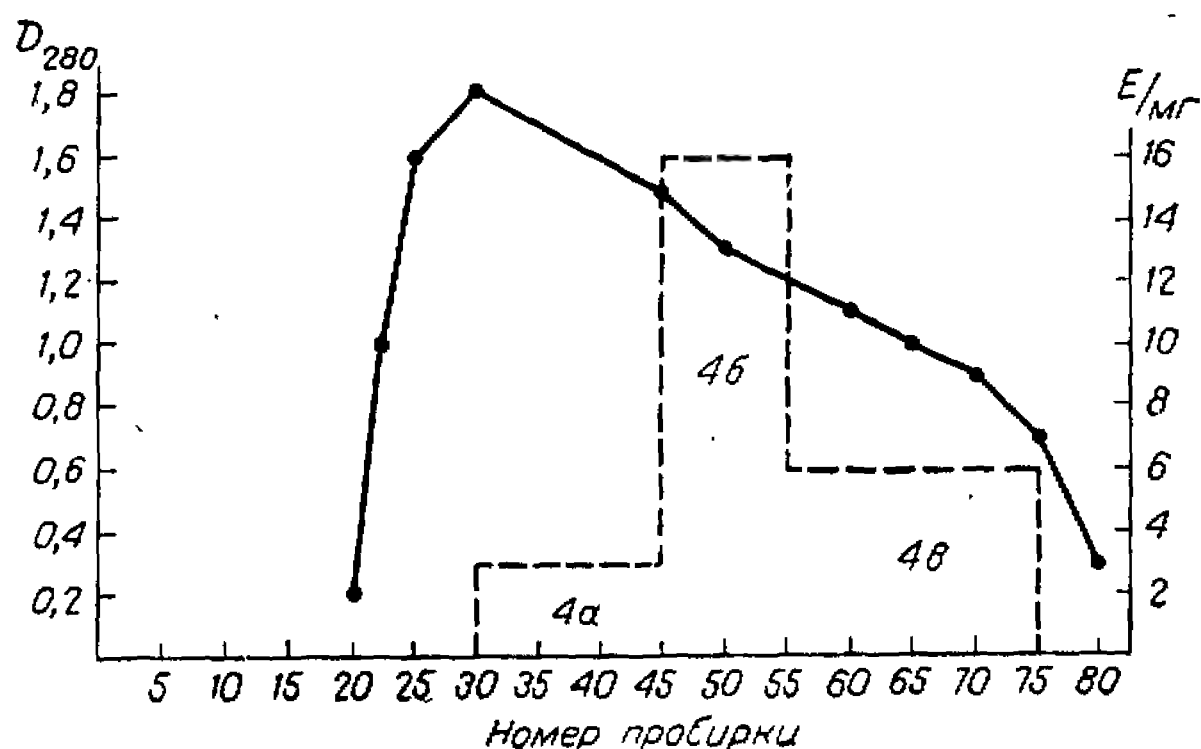


Рис. 15. Гельхроматография фракции 3а на сефадексе G-200. Условия опыта см. в тексте (4-й этап очистки).

На ординате — содержание белка в единицах оптической плотности при 280 нм (сплошная линия) и содержание кининогена в Е/мг белка (прерывистая линия); на абсциссе — номера фракций объем 3 мл.

державший максимальное количество активного компонента (20 Е в 1 мг).

Для получения препаратов высокоочищенного кининогена применяют метод элюции белка с геля после электрофоретического разделения препарата. Используют либо упомянутую стандартную систему Дэвиса, либо разделяют белки по методу Шапиро (Shapiro e. a., 1967) в специально подобранной системе. В последнем случае 3 мг препарата кининогена, полученного из фракции 46 (15 Е/мг), растворяют в 1,5 мл 0,1% раствора додецилсульфата натрия (SDS), выдерживают 12 ч при 37 °С, наносят на 12 колонок (6×100 мм) с 8,5% гелем, приготовленным на 0,1 М трис-НСl буфере (рН 8,0), содержащем 0,1% SDS, и подвергают электрофорезу в аппарате фирмы «Reanal» «Модель 69» при силе тока 5 мА на трубку. Окончание процесса определяют по положению полосы бромфенолового синего. Предварительно 0,5% раствор этого красителя добавляют к раствору белка (3 мкл на 0,1 мл) или к электродному буферу (1 мл на 1 л); продолжительность электрофореза составляет около 1½ ч.

Гели извлекают из трубок и для быстрее определения локализации белковых зон погружают в 12% раствор ТХУ на 5—10 мин до появления белых опалесцирующих колец на поверхности геля.

В качестве контроля один гель проявляют в течение ночи 2% раствором амидочерного 10Б в смеси 20% раствора уксусной кислоты и ацетона в отношении 1:1 по объему; избыток красителя удаляют электрофоретически. Проверяют соответствие полос, выявленных ТХУ, окрашенным полосам контрольного геля.

Наиболее широкие выявленные ТХУ полосы белка, имеющего подвижность кининогена, вырезают из столбиков геля помещают в пробирку с минимальным объемом 0,2 М триэтиламинобикарбонатного буфера (рН 8,0), содержащего 0,1% SDS, и оставляют на 2—3 ч при 37 °С. Элюат сливают, гели замораживают, вновь приливают к ним тот же буфер и повторяют операцию еще 3—4 раза. Объединенные элюаты лиофилизируют, сухой остаток растворяют в небольшом количестве воды и тщательно обессоливают на колонке с биогелем Р-4, уравновешенным водой. Собирают фракции, поглощающие при 280 нм.

В табл. 21 приведены результаты одного из опытов по выделению и очистке кининогена.

Таблица 21

Выделение и очистка кининогена из плазмы крови кролика

Этап очистки	Фракция	Содержание белка, г	Е/мг белка	Е на фракцию	Выход, в %	Степень очистки
1-й. Плазма крови (400 мл)		22	0,07	1540	100	1
2-й. Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе А-50	2а 2б	1,5 0,3	0,8 0,5	1200 150	72 10	11
3-й. Сорбция на гидроксилапатите фракции 2а	3а	0,3	3,5	1050	68	50
4-й. Гельхроматография на сефадексе G-200 фракции 3а: №№ пробирок:						
30—44	4а	0,1	2,0	200	13	30
45—55	4б	0,04	15,0±2	600	39	210
56—70	4в	0,08	5,0	400	25	70
5-й. Электрофорез в полиакриламидном геле фракции 4б	5а	0,016	20,0±2	320	21	300

СВОЙСТВА ОЧИЩЕННОГО КИНИНОГЕНА

Основные свойства кининогена кролика изучены на препарате 4б. Этот препарат не гомогенен при электрофорезе в полиакриламидном геле; на электрофореграмме, помимо основной полосы в области α_1 -глобулина, проявляются несколько слабых полос в области α_2 - и β_2 -глобулинов.

Относительная молекулярная масса выделенного кининогена, определенная методом гельфильтрации через сефадекс G-200, равна 54 000—56 000; изоэлектрическая точка данного белка лежит в пределах рН 3,15—3,5 (Т. П. Егорова, Т. С. Пасхина, 1967).

Данный кининоген является субстратом для калликреинов из плазмы крови кролика, из слюны и мочи человека, а также для трипсина. Такой препарат кининогена может быть использован в модельных экспериментах для изучения кининогеназной реакции.

Из 1 мг препарата кининогена 4б трипсин отщепляет 15 ± 2 мкг брадикинина, что соответствует 60—80% содержанию кининогена в препарате. Из 1 мг электрофоретически гомогенного препарата 5а (см. табл. 21) трипсин отщепляет 20 ± 2 мкг брадикинина, что соответствует чистому кининогену с относительной молекулярной массой 50 000. Последний препарат был использован для определения N- и C-концевых аминокислот в молекуле кининогена кролика.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ N (КИНИНАЗА 1) В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.

СИНТЕЗ ГИППУРИЛ-L- АРГИНИНОВОЙ КИСЛОТЫ

С. С. ТРАПЕЗНИКОВА, Е. Б. РОССИНСКАЯ,
Б. Л. КРАЙНОВА,
Е. С. ЧАМАН, Т. С. ПАСХИНА

Карбоксипептидаза N (Erdös, 1961) плазмы крови человека и млекопитающих является первой хорошо изученной кининазой (кининаза 1). Фермент инактивирует брадикинин путем отщепления C-концевого аргинина.

Кратковременный гипотензивный эффект брадикинина и короткий период его полураспада (13—17 с) определяются в значительной степени присутствием в плазме крови карбоксипептидазы N (Т. С. Пасхина, 1966; Erdös, Yang, 1970). Содержание этого фермента в плазме крови относительно постоянно; снижение его активности наблюдается при циррозах печени, увеличение — в последнем триместре беременности (Erdös, e. a., 1965*; Erdös, Yang, 1970); у новорожденных уровень активности фермента в плазме крови в 2 раза ниже, чем у взрослых. При ряде заболеваний, которые сопровождаются гиперфибринолизом или гиперкоагуляцией, а также активированием кининовой системы, определение уровня карбоксипептидазы N в плазме крови приобретает важное клиническое значение.

Активность карбоксипептидазы N в плазме крови может быть определена как биологическим (инактивация брадикинина), так и химическим методом; в последнем случае в качестве субстратов используют гиппурил-L-лизин (С. С. Трапезникова, Т. С. Пасхина, 1968; Erdös e. a., 1965)*, гиппурил-L-аргининовую кислоту (ГАК) (Т. С. Пасхина и др., 1972*; Erdös e. a., 1967) или динитрофенилированный трипептид — ДНФ-гли-гли-арг (Л. А. Люблинская и др., 1973)*; более точные результаты получают с двумя последними субстратами.

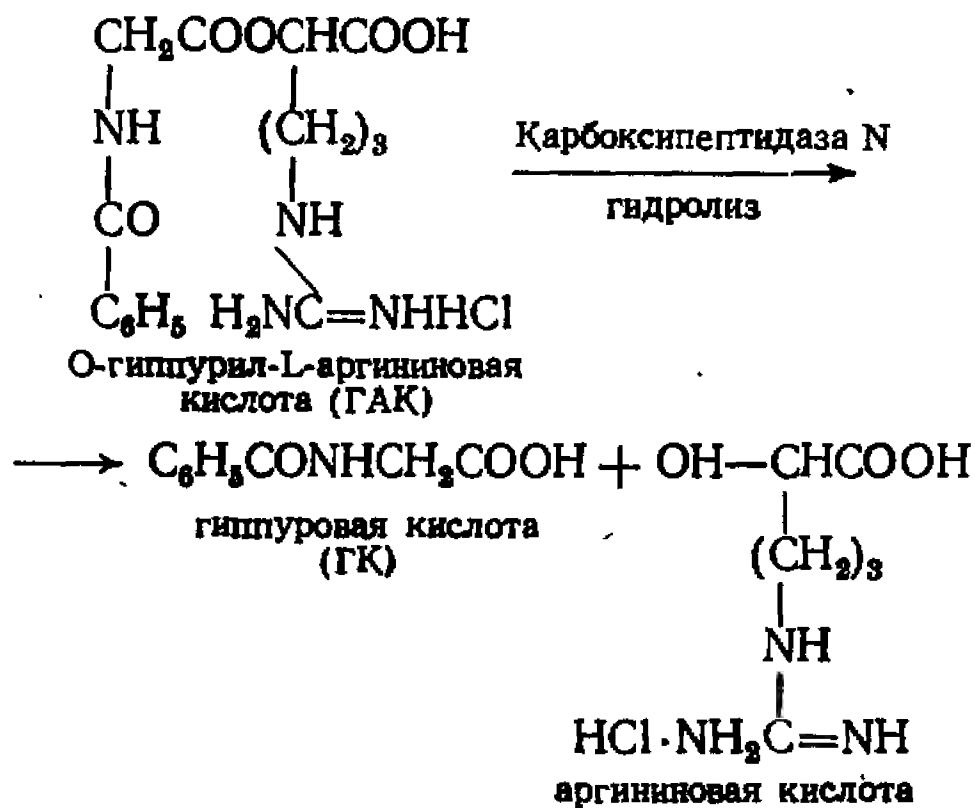
Определение эстеразной активности карбоксипептидазы N в сыворотке крови является наиболее простым и быстрым методом; фермент гидролизует эфирную связь значительно быстрее, чем пептидную; ограничивающим фактором оказались дефицитность ГАК и сложность синтеза этого эфира.

Ниже приведены пропись спектрофотометрического метода измерения эстеразной активности карбоксипептидазы N в сыворотке крови человека по скорости гидролиза ГАК (Т. С. Пасхина и др., 1972)*, представляющего собой модификацию метода Эрдош и соавт. (Erdös e. a., 1967)*, и пропись оригинального метода синтеза ГАК (Б. Л. Крайнова и др., 1970).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ N В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Принцип метода

Фермент катализирует следующую реакцию:



Принцип метода основан на определении количества гиппуровой кислоты (ГК), освобождающейся при расщеплении в ГАК сложноэфирной связи; ГК обладает при 254 нм более высоким коэффициентом молярной экстинкции ($2,17 \cdot 10^3$), чем ГАК ($1,06 \cdot 10^3$), в связи с чем увеличение оптической плотности пробы при 254 нм пропорционально скорости гидролиза ГАК ферментом, содержащимся в сыворотке крови.

Реактивы

0,05 М трис-НСІ буфер (рН 8,0).

1 мМ раствор ГАК·НСl в 0,05 М трис-НСl буфере, рН 8,0 (субстратный раствор). 3,70 мг ГАК·НСl растворяют в 10 мл буферного раствора.

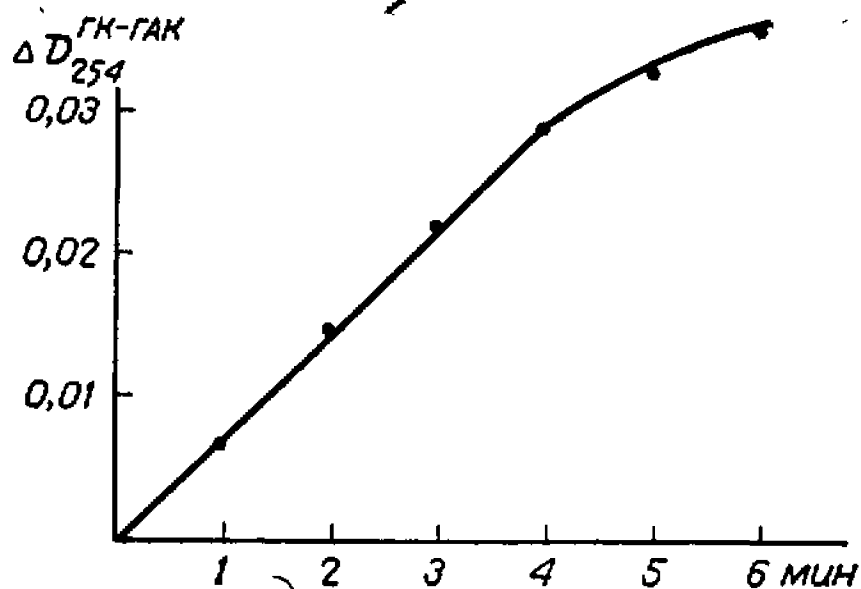
1 мМ раствор ГК в том же буфере; 17,9 мг ГК растворяют в 100 мл трис-HCl буфера. ГК перед анализом перекристаллизовывают из этанола.

Ход анализа

Буферный раствор и раствор субстрата нагревают на водяной бане до 37 °С; затем в термостатированную кювету (37 °С) спектрофотометра вносят 1,5 мл 0,05 М

Рис. 16. Гидролиз гиппурил-L-аргининовой кислоты (ГАК) разведенной в 100 раз сывороткой крови человека. Условия реакции см. в тексте.

На ординате — прирост оптической плотности в пробе по отношению к 0,5 мМ раствору ГАК·НСl при 254 нм; на абсциссе — время гидролиза ГАК в минутах.



трис-НСl буфера (рН 8,0) и 30 мкл (микропипетка!) сыворотки крови человека; перемешивают тонкой стеклянной палочкой и добавляют субстрат — 1,5 мл 1 мМ раствор ГАК·НСl в том же буфере. Таким образом, перед началом определения активности фермента сыворотка крови оказывается разведенной в 100 раз, а конечная концентрация ГАК составляет 0,5 мМ.

Немедленно после внесения субстрата и перемешивания начинают регистрировать прирост оптической плотности в пробе при 254 нм, используя в качестве контроля 0,5 мМ раствор ГАК·НСl в том же буфере. Первый отсчет, величина которого определяется содержанием белка в пробе, принимают за нулевой; далее измерение проводят в течение 5 мин, делая отсчеты через каждые 30—60 с. По окончании измерения вычисляют величину ΔD_{254} за 1 мин, используя только линейную часть кривой зависимости прироста оптической плотности от времени. Поскольку абсолютная скорость реакции невелика (ΔD_{254} за 1 мин составляет 0,007—0,009), необходима большая тщательность при выполнении всего анализа; постановка параллельной пробы обязательна. Следует строго следить за поддержанием температуры на необходимом уровне (37 °С), так как данная ферментативная реакция отличается высоким температурным коэффициентом.

На рис. 16 показана скорость гидролиза ГАК разбавленной в 100 раз сывороткой крови человека; опыт выполнен в строгом соответствии с описанными выше условиями определения. Как видно из рис. 16, пропорциональность между образованием ГК и временем реакции сохраняется только в течение первых 3—4 мин, что соответствует расщеплению 10—15% субстрата. Быстрое на-

рушение линейного хода реакции, по-видимому, обусловлено торможением ее продуктом реакции — аргининовой кислотой.

Расчет активности фермента в сыворотке крови

Активность фермента вычисляют из найденной в опыте величины ΔD_{254} за 1 мин ($\Delta D_{254}^1 \text{ мин}$), из которой по калибровочному графику (рис. 17) или расчетному коэффициенту находят соответствующее этой величине количество мкмолей ГАК, гидролизovaných ферментом за 1 мин в пробе объемом в 3 мл. В окончательной форме результаты выражают в мкмольх ГАК, гидролизovaných 1 мл сыворотки крови за 1 мин или, что то же самое, числом единиц фермента — Е (международная единица активности фермента) в 1 мл сыворотки крови.

Для построения калибровочного графика из исходных растворов (1 мМ) ГК и ГАК приготавливают серию разбавленных растворов — 0,0625, 0,125, 0,25 и 0,50 мМ, используя для разведения 0,05 М трис-НСl буфер (рН 8,0). Оптическую плотность растворов ГК и ГАК измеряют против буферного раствора, вычисляют разность в их оптической плотности и наносят ее на график против раствора соответствующей молярности.

Как видно из приведенного на рис. 17 калибровочного графика, разность в оптической плотности растворов ГК против ГАК, $\Delta D_{254}^{\text{ГК-ГАК}}$, равная 0,1, соответствует содержанию 0,151 мкмольа ГК в 1 мл раствора. Поскольку прирост ГК эквивалентен убыли ГАК, то найденная величина используется как расчетный коэффициент в следующей формуле:

$$\frac{\Delta D_{254}^1 \text{ мин} \cdot 1,51 \cdot 3 \cdot 1}{1 \cdot 0,03} = \Delta D_{254}^1 \text{ мин} \cdot 151 \text{ мкмоль ГАК/1 мл}$$

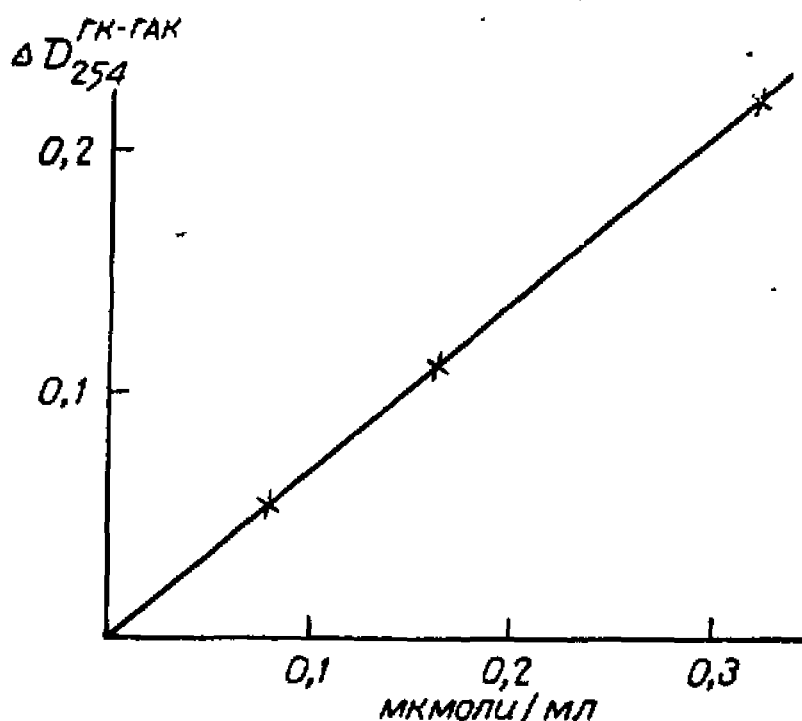
сыворотки крови за 1 мин,

где $\Delta D_{254}^1 \text{ мин}$ — найденный в опыте прирост оптической плотности за 1 мин; 1,51 — мкмолей ГАК, гидролизovaných в пробе объемом 1 мл при $\Delta D_{254}^{\text{ГК-ГАК}} = 1,0$; 3 — объем пробы; 0,03 — количество взятой для анализа сыворотки крови в миллилитрах.

Используя данный метод, мы нашли, что активность карбоксипептидазы N в сыворотке крови здорового че-

Рис. 17. Калибровочный график для определения гиппуровой кислоты (ГК) в присутствии гиппурил-L-аргининовой кислоты (ГАК) спектрофотометрическим методом.

На ординате — разность оптических плотностей ГК и ГАК при 254 нм; на абсциссе — количество микролей ГК в 1 мл пробы.



ловека соответствует $1,05 \pm 0,21$ мкмоль ГАК/мин/мл (или Е/мл) ($M + m$); размах колебаний активности карбоксипептидазы N у отдельных лиц 0,75—1,35 Е/мл.

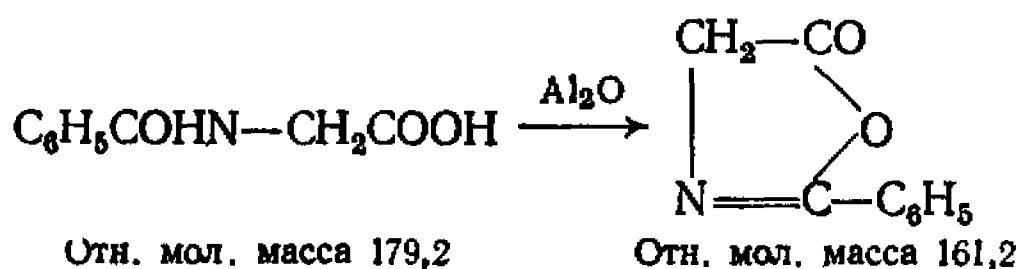
При ожоговом шоке отмечено снижение активности фермента на 30—40% (0,5—0,8 Е/мл), в период острой токсемии активность фермента возрастает почти в 2 раза, до верхней границы нормы (1,1—1,35 Е/мл) (Т. С. Пасхина и др., 1972)*. При латентно протекающем нефрите (поражение клубочкового аппарата почек) активность карбоксипептидазы N близка к норме ($0,90 \pm \pm 0,165$), в то время как при нефротическом синдроме, протекающем с выраженными явлениями гиперкоагуляции, тромбозов и гиперфибринемии, она значительно повышена и достигает $1,57 \pm 0,16$ Е/мл; возможно, что этот факт связан с увеличением в плазме крови количества пептидов, содержащих на С-конце остатки лизина и аргинина.

СИНТЕЗ О-ГИППУРИЛ- α -ОКСИ- δ -ГУАНИДИНО-L-ВАЛЕРИАНОВОЙ КИСЛОТЫ (О-ГИППУРИЛ-L-АРГИНИНОВОЙ КИСЛОТЫ)

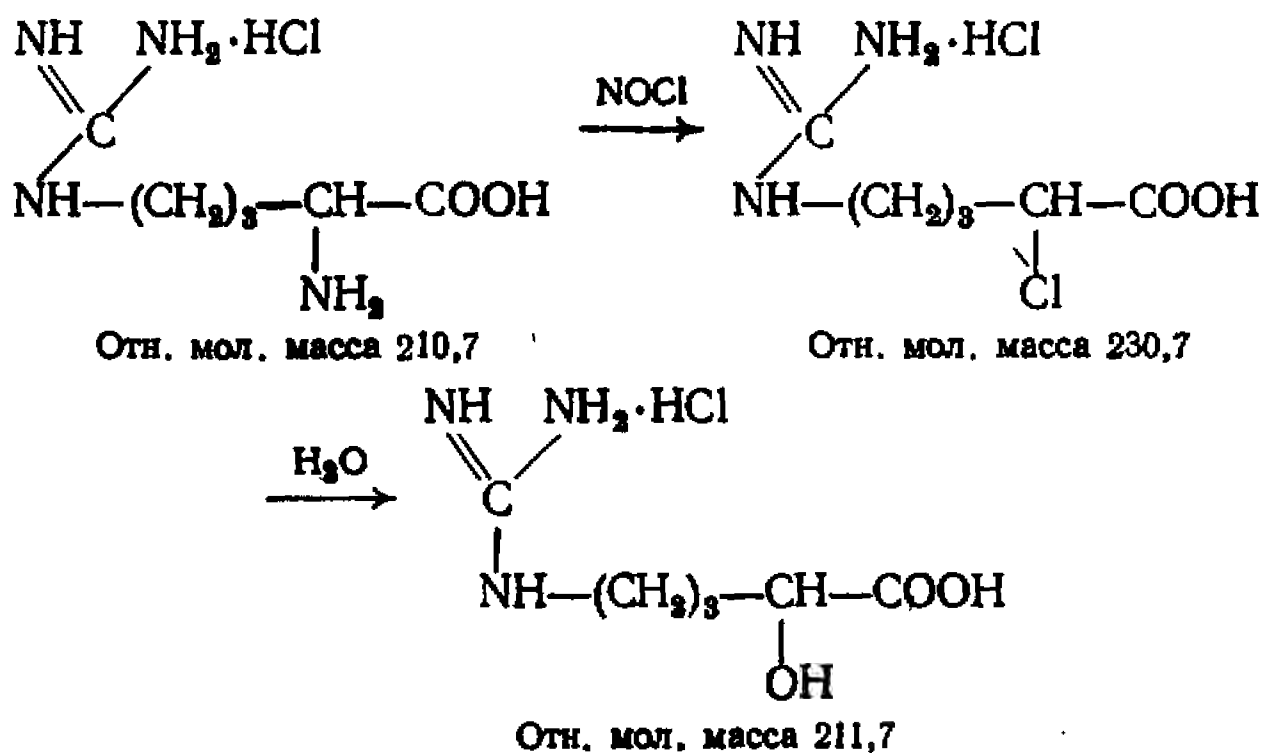
В литературе описан только один способ синтеза о-гиппурил-L-аргининовой кислоты (ГАК) из хлоргидрата гиппуровой кислоты и аргининовой кислоты (Folk, Gladner, 1959); выход ГАК после громоздкой очистки составляет лишь 6%. Предлагаемый ниже метод синтеза ГАК из 2-фенилоксазолинона-5 и аргининовой кислоты (Б. Л. Крайнова, С. С. Кипоренко, Е. С. Чаман, 1970) отличается простотой, хорошей воспроизводимостью и

высоким выходом (52,5%). Синтез ГАК протекает в 3 стадии.

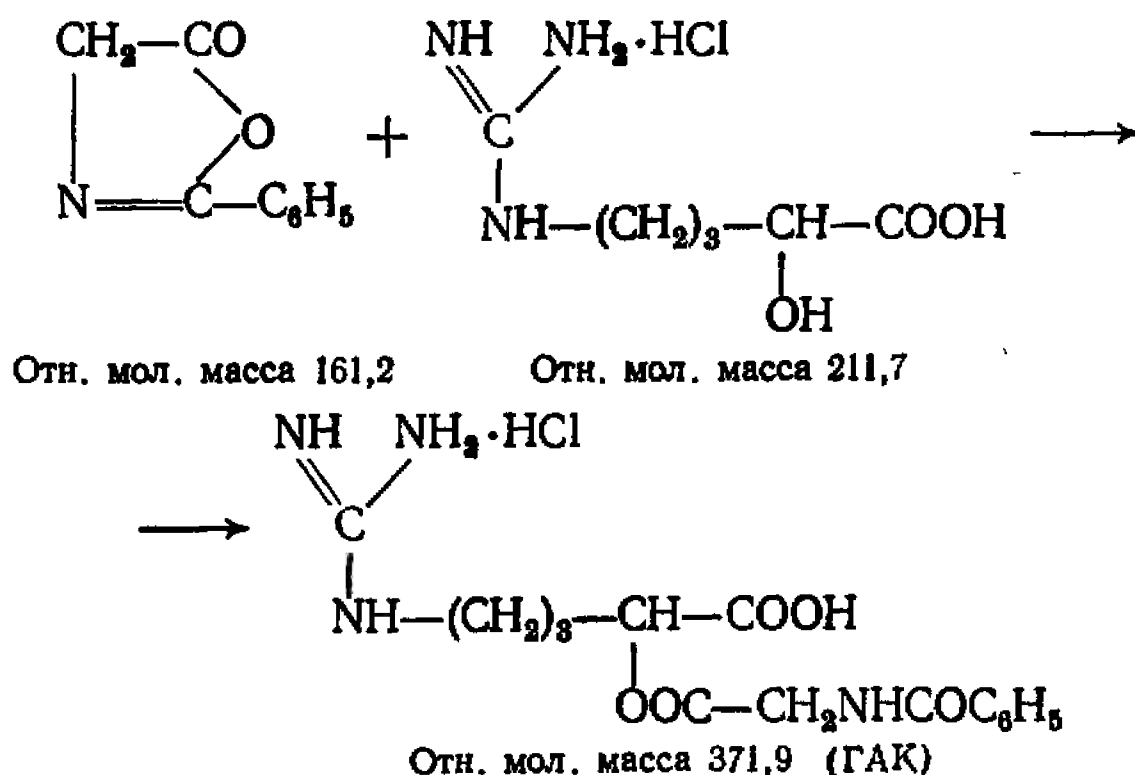
1. Получение 2-фенилоксазолинона-5 из гиппуровой кислоты



2. Получение хлоргидрата α -окси- δ -гуанидино-L-валиериановой кислоты (L-аргининовой кислоты) из аргинина гидрохлорида



3. Получение хлоргидрата о-гиппурил-L-аргининовой кислоты



Описание процесса

Получение 2 - фенилоксазолинона - 5

10 г гиппуровой кислоты (перекристаллизованной из воды и высушенной при 100°C) нагревают в водяной бане с 25 мл уксусного ангидрида при 80—90°C до полного растворения. Избыток уксусного ангидрида отгоняют в вакууме (t° бани 40—50°C) до начала кристаллизации остатка; остаток растирают с третичным бутиловым спиртом или смесью абсолютного этилового спирта с пентаном (1:2). Выход продукта 4,8—5 г, т. пл. 88—89°C.

Получение хлоргидрата L - α - хлор - δ - гуанидино - валериановой кислоты

Растворяют 5 г хлоргидрата L-аргинина в 7,5 мл концентрированной HCl (относительная плотность 1,18), добавляют 3,75 мл HNO₃ (относительная плотность 1,48) и нагревают 30 мин при 60°C на водяной бане; упаривают реакцию смесь досуха в вакууме (t° бани около 80°C), добавляют 10 мл концентрированной HCl и снова упаривают. Полученные кристаллы кристаллизуют из 6 н. раствора HCl (38 мл); фильтруют, промывают на фильтре 10 мл 6 н. раствора HCl и сушат над NaOH. Выход 3,3 г (60%), т. пл. 149,5—150°C.

Найдено %: Cl⁻ — 30,7; C₆H₃N₃O₂Cl₂. Вычислено %: Cl⁻ — 30,8.

Получение хлоргидрата L - α - окси - δ - гуанидино - валериановой кислоты (аргининовой кислоты)

Растворяют 7 г хлоргидрата L- α -хлор- δ -гуанидино-валериановой кислоты в 80 мл воды; кипятят 48 ч; раствор упаривают в вакууме; следы HCl отгоняют, дважды добавляя к остатку по 5 мл воды. К полученному маслу приливают 10 мл ацетона и оставляют до кристаллизации.

Выход 5,8 г (92%), т. пл. 151—153°C; для дальнейшей реакции можно вещество не очищать, но необходимо тщательно высушить над P₂O₅.

Для анализа продукт кристаллизуют из смеси воды с ацетоном (20:80), т. пл. 158—159°C.

Найдено %: Cl⁻ — 16,60; C₆H₁₄N₃O₃Cl. Вычислено %: Cl⁻ — 16,52.

Получение хлоргидрата о-гиппурил- L-аргининовой кислоты

Кипятят смесь 1,9 г хлоргидрата аргининовой кислоты и 3,2 г 2-фенилоксазолинона-5 (двукратный избыток) в 30 мл трет-бутанола. Реакцию проводят до полного отсутствия аргининовой кислоты, для чего добавляют порциями еще 1,6 г оксазолон. Общее время нагревания реакционной смеси около 4 ч; окончание реакции проверяют хроматографически* по отсутствию аргининовой кислоты. Растворитель отгоняют в вакууме, остаток растворяют в воде, фильтруют от кристаллов гиппуровой кислоты; фильтрат экстрагируют этилацетатом до полного удаления остатков гиппуровой кислоты, нагревают с углем, фильтруют и упаривают в вакууме до суха. Высушивают двукратной отгонкой абсолютного спирта по 10 мл. Кристаллы ГАК·HCl растирают с эфиром, фильтруют и сушат (над P_2O_5).

Выход 1,7 г (52,5%).

Полученный продукт (ГАК) хроматографируют на бумаге Ватман № 1, в системе бутанол—этанол—вода (4 : 1 : 1); хроматограмму окрашивают реактивом Сакагучи; $R_f = 0,40$.

Найдено %: С — 46,23; Н — 5,77; N — 14,20; Cl — 9,09; $C_{15}H_{21}N_4O_5Cl \cdot H_2O$.

Вычислено %: С — 46,09; Н — 5,90; N — 14,34; Cl — 9,30.

Полученный настоящим способом хлоргидрат ГАК по величине R_f и данным элементарного анализа не отличается от описанного в литературе (Wolff e. a., 1962).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТРИПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

В. Ф. НАРТИКОВА, Т. С. ПАСХИНА

Природные ингибиторы протеиназ и в том числе ингибиторы, присутствующие в плазме крови, интенсивно изучаются в последние годы. Интерес к ним обусловлен

* Реакционную смесь хроматографируют на бумаге Ватман № 1 в системе бутанол—этанол—вода (4 : 1 : 1); в качестве свидетеля используют аргининовую кислоту; хроматограмму окрашивают реактивом Сакагучи.

теми разнообразными и важными функциями, которые ингибиторы протеиназ выполняют в организме как регуляторы таких сложных и взаимосвязанных ферментных систем, как системы свертывания крови, фибринолиза, кининовая система, система комплемента, а также как факторы защиты от инфекции; важная роль принадлежит ингибиторам протеиназ и в механизме оплодотворения яйцеклетки (Werle e. a., 1972).

Общая антитриптическая активность (АТА) сыворотки крови человека определяется присутствием в ней по крайней мере четырех ингибиторов трипсина: α_1 -антитрипсина, α_2 -макроглобулина, α -интер-ингибитора трипсина и термо- и кислотостабильного ингибитора трипсина (Heimburger e. a., 1971).

Более 90% АТА приходится на долю α_1 -антитрипсина, таким образом по величине АТА можно судить о количестве α_1 -антитрипсина в сыворотке крови. Определение этого ингибитора в сыворотке крови человека имеет диагностическое значение: наследственная недостаточность α_1 -антитрипсина часто сопровождается неспецифическими заболеваниями легких у взрослых (Laurell, Eriksson, 1965) и циррозами печени у детей (Shagr e. a., 1969)*.

α_1 -Антитрипсин относится к так называемым «острофазным белкам», содержание которых в плазме крови значительно увеличивается при острых воспалительных процессах, инфекционных заболеваниях, массивных хирургических вмешательствах. Во всех этих случаях наблюдается значительное увеличение АТА; почти в 2 раза возрастает АТА при беременности. Таким образом, определение АТА при некоторых физиологических и патологических состояниях организма представляет значительный интерес.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Описанный ниже метод определения АТА в сыворотке крови человека представляет собой нашу модификацию спектрофотометрического метода (Storico, Schwich, 1964). Метод основан на определении торможения БАЭЭ-эстеразной активности трипсина разведенной в 50 раз сывороткой крови человека; гидролиз БАЭЭ (этилового эфира N- α -бензоил-L-аргинина) трипсином измеряют по приросту оптической плотности пробы при 253 нм (ΔD_{253}). АТА сыворотки крови вычисляют по

разности в скорости гидролиза БАЭЭ трипсином в контрольной (без сыворотки крови) и опытной (с добавлением сыворотки крови) пробах и выражают числом условных ингибиторных единиц (ИЕ) в 1 мл сыворотки крови. За 1 ИЕ принято такое количество сыворотки крови, которое тормозит гидролиз трипсином 1 мкмоль БАЭЭ за 1 мин при 25 °С.

РЕАКТИВЫ

0,05 М трис-НСl буфер (рН 8,0).

1,5 мМ раствор БАЭЭ·НСl (этиловый эфир N- α -бензоил-L-аргинина гидрохлорид, препарат Московского з-да хим. реактивов им. Войкова) в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 8,0). 6,2 мг БАЭЭ·НСl растворяют в 12 мл буфера; раствор готовят в день определения во избежание спонтанного гидролиза БАЭЭ.

0,1% раствор трипсина в 1 мМ растворе НСl, содержащей СаCl₂ в 10 мМ концентрации; 1 мг трипсина (кристаллический препарат фирмы «Спофа», Чехословакия, или отечественный препарат Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова) растворяют в 1 мл указанного растворителя; раствор может храниться 7—10 дней при 4 °С. Перед определением 0,1% раствор трипсина разводят в 10 раз 1 мМ НСl.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Приступая к анализу, сыворотку крови человека разводят физиологическим раствором в 50 раз (0,1 мл сыворотки крови добавляют к 4,9 мл 0,9% раствора NaCl). В кюветах спектрофотометра готовят две пробы — опытную и контрольную. Опытная проба содержит 1,9 мл 0,05 М трис-буфера (рН 8,0), 0,1 мл разведенной 1 : 50 сыворотки крови и 0,1 мл раствора трипсина (10 мкг). Контрольная проба содержит 2 мл трис-буфера и 0,1 мл раствора трипсина (10 мкг). Обе пробы выдерживают в термостатированных кюветах спектрофотометра 5 мин при 25 °С, затем добавляют в каждую по 1 мл раствора БАЭЭ; быстро перемешивают и прирост оптической плотности (ΔD_{253}) в них измеряют при 253 нм против пробы, содержащей только реактивы (смешивают 2 мл трис-буфера с 1 мл раствора БАЭЭ); отсчеты делают каждую минуту в течение 4—5 мин.

ВЫЧИСЛЕНИЕ АТА

Из линейного участка кривой зависимости прироста оптической плотности при 253 нм от времени реакции находят прирост оптической плотности (ΔD_{253}) за 1 мин для опытной и контрольной проб; разность между этими величинами используют для вычисления АТА по формуле:

$$\frac{(v_0 - v_i) \cdot 2,73}{0,1} \cdot 50 = \text{число ИЕ/мл сыворотки крови,}$$

где v_0 и v_i — скорости гидролиза БАЭЭ трипсином в контрольной и опытной пробах, соответственно равные приросту оптической плотности ΔD_{253} за 1 мин; 2,73 — расчетный коэффициент для вычисления количества БАЭЭ, гидролизованного в пробе при данных условиях в мкмольях; получен из данных по разности оптической плотности 1 мМ растворов БА и БАЭЭ, равной 1,1 и объема пробы, равного 3 мл ($\frac{3}{1,1} = 2,73$); 0,1 — количество взятой для анализа разведенной сыворотки крови (опытная проба); 50 — фактор разведения.

Рекомендуемое нами для анализа количество сыворотки крови, соответствующее 0,1 мл разведенной 1 : 50 сыворотки крови, подобрано так, чтобы величина торможения не превышала 50—60%. Если АТА в измеряемой сыворотке крови очень высока и торможение превышает 50—60%, необходимо взять для анализа 0,05 мл разведенной сыворотки крови.

Поскольку гидролиз БАЭЭ трипсином представляет собой ферментативную реакцию с высоким температурным коэффициентом, необходимо строго придерживаться температуры 25 °С. Если спектрофотометр не снабжен термостатированным устройством, реакцию проводят в пробирках в термостатированной водяной бане; содержимое проб переливают в кюветы перед каждым измерением оптической плотности.

При применении данного метода нами найдено, что АТА в нормальной сыворотке или плазме крови человека составляет 30 ± 7 ИЕ/мл; увеличение АТА в 2—4 раза имеет место при ожоговой болезни человека (при ее переходе в стадию токсемии) и может рассматриваться в качестве диагностического показателя (Т. С. Пасхина и др., 1972)*.

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКООЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА ТЕРМО- И КИСЛОСТАБИЛЬНОГО ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА (ТКСТИ) ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРОЛИКА

В. Ф. НАРТИКОВА, О. Г. ОГЛОБЛИНА,
Р. И. ЯКУБОВСКАЯ,
Л. В. ПЛАТОНОВА, Т. С. ПАСХИНА

Появление в последнее время ряда работ по выделению (из различных источников) и очистке термо- и кислотостабильных ингибиторов трипсина белковой породы, играющих, по-видимому, особую физиологическую роль в организме млекопитающих и человека, свидетельствует о большом интересе к изучению свойств этих соединений.

Высокоактивный ингибитор трипсина и химотрипсина (Т. С. Пасхина, В. Ф. Нартикова, 1966; В. Ф. Нартикова и Т. С. Пасхина, 1970) отличается от всех других ингибиторов α_1 -гликопротеидной природы, присутствующих в плазме крови человека и млекопитающих, наименьшей относительной молекулярной массой и наличием в его структуре 5—6 дисульфидных связей; последнее свойство обеспечивает стабильность ингибитора к нагреванию в кислой среде. Термо- и кислотостабильный ингибитор трипсина (ТКСТИ) из крови кролика имеет среднюю относительную молекулярную массу около $23\,000 \pm 1000$, $pH_1 \sim 2,9$; содержание углеводных компонентов 22%; $K_1 = 1 \cdot 10^{-10}$ М (для трипсина); от общей антитриптической активности (АТА) сыворотки крови кролика активность ТКСТИ составляет 12—16%. Уровень содержания термо- и кислотостабильного ингибитора в сыворотке крови кролика в 5—10 раз выше, чем в сыворотке крови человека.

Этим обстоятельством и объясняется выбор нами объекта исследования.

Ниже описаны два метода выделения ТКСТИ. Один из них разработан на основе классических методов хроматографии в сочетании с экстракцией ингибитора 2,5% раствором трихлоруксусной кислоты, другой — на основе биоспецифической хроматографии в колонке с трипсином, ковалентно связанным с сефарозой 4Б.

1-й МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ТКСТИ

Метод представляет модификацию ранее описанного нами метода выделения ТКСТИ из сыворотки крови кролика (В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина, 1969).

Принцип метода

В основу получения высокоочищенного препарата ТКСТИ положены его кислотные свойства ($pH_1 \approx 2,9$), обеспечивающие прочную связь ингибитора с анионитом, и его растворимость в 2,5% растворе (ТХУ), позволяющую изолировать ингибитор от значительной части неактивных белков. В качестве исходного материала используют фракцию белков сыворотки крови кролика, осажденную $(NH_4)_2SO_4$ при 0,5 насыщения; окончательная очистка достигается гельфильтрацией ТКСТИ на сефадексе G-200.

Реактивы

Трипсин кристаллический (Ленинградский мясокомбинат им. С. М. Кирова или фирмы «Srofa», Чехословакия).

Этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ, «California Corporation», США).

ДЭАЭ-сефадекс А-50, средний; сефадекс G-25, средний; сефадекс G-200 («Pharmacia», Швеция).

0,05 М трис-HCl буфер (pH 8,0).

0,01 М фосфатный буфер (pH 6,7—6,8).

5% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Определение активности ТКСТИ

Активность ТКСТИ в процессе его выделения и очистки определяют по торможению БАЭЭ-эстеразного действия трипсина (В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина, 1969).

Ход определения: 0,1 мл раствора трипсина (10 мкг) в 2,5 мМ растворе HCl смешивают в кювете спектрофотометра с 1,9 мл раствора ингибитора (2—100 мкг препарата ТКСТИ в зависимости от степени очистки) в 0,5 М трис-HCl буфере (pH 8,0) и после преинкубации в течение 5 мин при 25°C добавляют 1 мл 0,015 М раствора БАЭЭ. В контрольную пробу

вместо ингибитора добавляют 1,9 мл буферного раствора. Прирост оптической плотности в опытной и контрольной пробах измеряют на спектрофотометре (СФ-4) при 253 нм против пробы, содержащей только реактивы; отсчеты делают через минуту. Активность ТКСТИ вычисляют по разности в приросте оптической плотности (ΔD_{253}) в контрольной и опытной пробах и выражают в ИЕ. Условная единица активности ингибитора (ИЕ) соответствует количеству ингибитора, которое тормозит гидролиз трипсином 1 мкмоль БАЭЭ в 1 мин в стандартных условиях.

В цельной сыворотке крови кролика и фракции 0,5 насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, содержащих термолабильный ингибитор трипсина, определение ТКСТИ проводят следующим образом: 0,5 мл сыворотки, разведенной 0,9% раствором NaCl в 20 раз (или 0,5 мл раствора препарата фракции 2, табл. 22), смешивают с 0,1 мл 0,5 М Na-ацетатного буфера (pH 4,1) и прогревают на водяной бане при 60 °C в течение 20 мин; после охлаждения и нейтрализации пробы добавлением 0,09 мл 0,5 н. раствора NaOH объем пробы доводят до 1,9 мл 0,05 М трис-HCl буфером (pH 8,0); далее определение активности ингибитора проводят так, как описано выше.

Получение высокоочищенного препарата ТКСТИ

**1-й и 2-й этапы. Получение сыворотки
крови кролика и осаждение
белков сыворотки сульфатом аммония**

Кровь собирают из сонной артерии кроликов в полиэтиленовый стакан, выдерживают 20 мин при 37 °C и 45 мин при 4 °C. Для отделения сыворотки кровь центрифугируют в течение 30 мин при 1500 g. Полученную сыворотку крови разводят в 2 раза водой и добавляют к ней сухой сульфат аммония до 0,5 насыщения. Через 18 ч центрифугированием отделяют осадок, растворяют в минимальном объеме воды и диализуют 36 ч против воды и 12 ч против 0,01 М фосфатного буфера (pH 6,8), содержащего 0,15 М NaCl. ТКСТИ практически полностью концентрируется в полученной фракции (см. табл. 22), при этом его удельная активность увеличивается в 3—4 раза по сравнению с исходной удельной активностью в сыворотке крови.

3 - й этап. Сорбция ТКСТИ на ДЭАЭ-сефадексе А-50

Фракцию 2, отдиализованную против фосфатного буфера (рН 6,8), содержащего 0,15 М NaCl, смешивают в стакане с ДЭАЭ-сефадексом А-50, уравновешенным тем же буфером. Высокий отрицательный заряд, который несет ТКСТИ при рН 6,8, обеспечивает его прочное связывание с анионитом. Фракцию белков, которая десорбируется с ДЭАЭ-сефадекса А-50 буферным раствором, содержащим 0,25 М NaCl, отбрасывают, собирают фракцию, которая десорбируется 0,5 М NaCl. Белки этой фракции осаждают $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 0,65 насыщения; осадок растворяют в воде и обессоливают на колонке (2,5×40 см) с сефадексом G-25, уравновешенной водой. Активность ТКСТИ в полученном растворе составляет 2 ИЕ/мг (фракция 3, см. табл. 22). Термолабильный ингибитор трипсина в этой фракции отсутствует.

4 - й этап. Экстракция ТКСТИ трихлоруксусной кислотой

К водному раствору фракции 3 добавляют равный объем 5% ТХУ. Нерастворимые белки после выдерживания в течение 30 мин при комнатной температуре отделяют центрифугированием, осадок дважды промывают 2,5% раствором ТХУ и промывные воды присоединяют к основному центрифугату. Объединенный раствор осторожно нейтрализуют добавлением 5% раствора NaOH и ТКСТИ осаждают $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 0,65 насыщения. Осадок растворяют в минимальном объеме воды, соли удаляют фильтрованием через колонку с сефадексом G-25; белковый раствор лиофилизируют (фракция 4, см. табл. 22). Экстракция ТХУ увеличивает активность ТКСТИ по отношению к предыдущей стадии в 5 раз; потери активности на этом этапе связаны, вероятно, с осаждением некоторой части ТКСТИ вместе с большим количеством неактивных белков.

5 - й этап. Гельфильтрация ТКСТИ на сефадексе G-200

На последнем этапе очистки ТКСТИ отделяют от высокомолекулярных компонентов гельфильтрацией че-

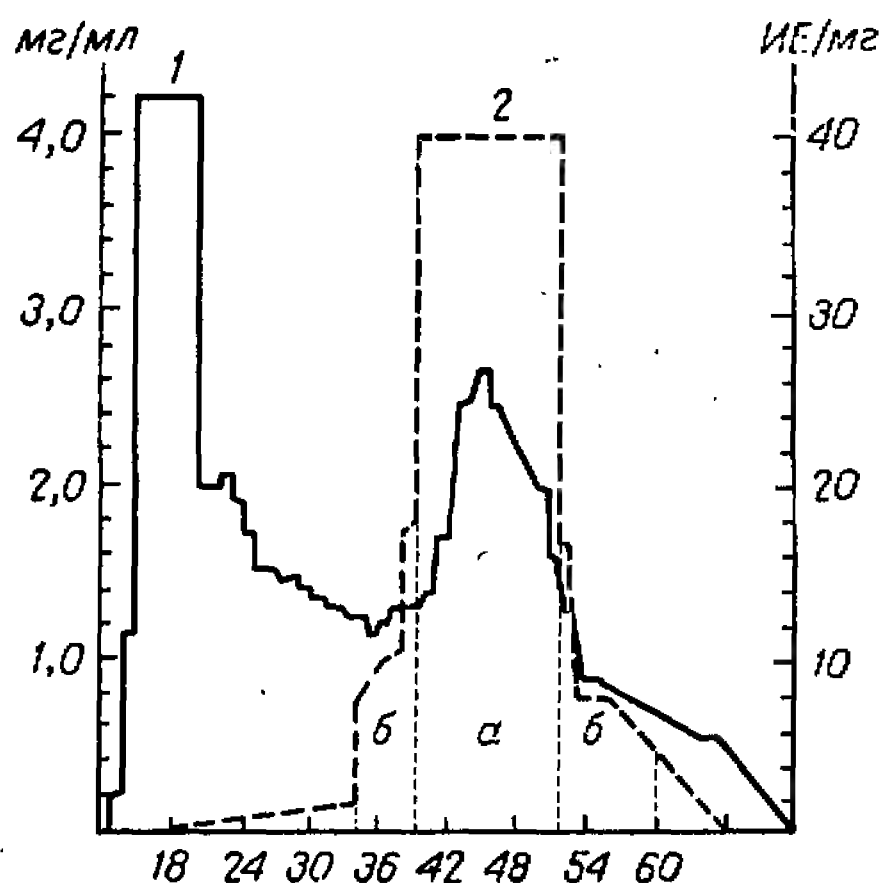


Рис. 18. Очистка ТКСТИ (фракция 4, см. табл. 22) гельфильтрацией через сефадекс G-200. Условия опыта см. в тексте (5-й этап).

На ординате — содержание белка в мг/мл и удельная активность ТКСТИ в IE/мг белка; на абсциссе — порции элюата по номерам пробирок коллектора.
1 — белок; 2 — ТКСТИ; а — фракция ТКСТИ (5а) с удельной активностью 40 IE/мг; б — фракция ТКСТИ (5б) с удельной активностью 10 IE/мг.

рез сефадекс G-200 в колонке размером 1×65 см. Сефадекс уравнивают 0,01 М фосфатным буфером (рН 6,8), содержащим 0,2 М NaCl. Фракцию 4 растворяют в 1—1,5 мл буфера и вносят в колонку; скорость тока буфера 4—5 мл/ч; элюат собирают малыми порциями (по 0,6 мл). Антитриптическую активность определяют в каждой 2-й порции. На рис. 18 представлены элюционные кривые одного из таких опытов. Как видно из данных, представленных на рис. 18, при гельфильтрации ТКСТИ на сефадексе G-200 первым на кривой элюции появляется большой пик белка, не обладающего антитриптической активностью; активность ТКСТИ полностью совпадает со вторым белковым пиком. Фракции с наибольшей антитриптической активностью объединяют, обессоливают на колонке с сефадексом G-25 и лиофилизируют (фракция 5а, см. табл. 22).

В табл. 22 представлены порядок операций в процессе выделения ингибитора, удельная активность фракций на отдельных этапах очистки и выход ТКСТИ по общей активности.

Как видно из табл. 22, используя данный метод выделения ТКСТИ, получают препарат ингибитора, удельная активность которого равняется 35—42 IE, а выход составляет 27%; из 1 л сыворотки крови кролика метод позволяет получить 18—19 мг высокоочищенного препарата ТКСТИ.

**Выделение и очистка ТКСТИ из сыворотки крови кролика
(1-й метод выделения)**

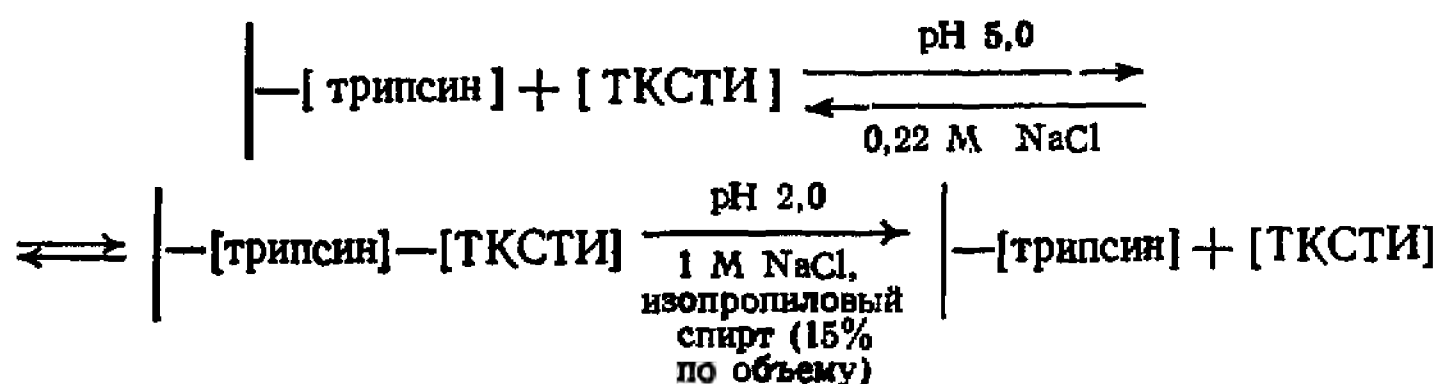
Этап очистки	Фракция	Количество белка, г	Активность ТКСТИ		Выход ТКСТИ по ИЕ, %	Степень очистки
			ИЕ/мг белка	ИЕ во всей фракции		
1-й. Сыворотка крови кролика (1100 мл)		66	0,04—0,045	2800	100	1
2-й. Фракция насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5	2	19	0,14—0,15	2660	91	3—4
3-й. ДЭАЭ-сефадекс; фракция 0,25—0,5 М NaCl	3	0,935	2,0	1870	67	40—50
4-й. Экстракция 2,5% раствором ТХУ	4	0,089	10,0	890	32	200—250
5-й. Гельфильтрация на сефадексе G-200	5а	0,020	35—42	750	27	900—1000
	5б	0,009	10—13	110	4	

2-й МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ТКСТИ

Принцип метода

ТКСТИ отделяют от термо- и кислотолабильных ингибиторов трипсина и химотрипсина, присутствующих в сыворотке крови кролика, путем прогревания сыворотки в течение 1 ч при рН 4,0 и 55°C. Фракцию белков сыворотки, осаждающуюся сульфатом аммония в 0,30—0,55 зоне насыщения, собирают и ТКСТИ выделяют из нее путем специфического связывания с трипсин-сефарозой 4Б при описанных ниже условиях (схема IV).

После разобщения фермент-ингибиторного комплекса в условиях высокой ионной силы, сдвига значения рН от 5 до 2 и присутствия изопропилового спирта получают ТКСТИ в виде высокоочищенного препарата, не содержащего ни других ингибиторов трипсина, ни примеси балластных гликопротеидов.



Реактивы

Трипсин кристаллический (Ленинградский мясокомбинат им. С. М. Кирова или фирма «Srofa», Чехословакия).

Этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина, БАЭЭ («California Corporation», США).

Сефароза 4Б («Pharmacia», Швеция).

Изопропиловый спирт, х. ч. (Шосткинский завод хим. реактивов).

Сефадекс G-25, средний («Pharmacia», Швеция).

Трасилол («Bayer», ФРГ).

0,05 М трис-HCl буфер (pH 8,0).

Буфер А: 0,05 М боратный буфер (pH 8,9), содержащий 0,01 М CaCl₂.

Буфер Б: 0,1 М ацетатный буфер (pH 5,0), содержащий 0,22 М NaCl и 0,01 М CaCl₂.

Определение эстеразной активности иммобилизованного трипсина

0,1 мл сцеженной суспензии трипсин-сефарозы 4Б при 25 °С смешивают с 1,9 мл 0,05 М трис-HCl буфера (pH 8,0), затем добавляют 1 мл 0,015 М раствора БАЭЭ в том же буфере. Через 3 мин пробу фильтруют через стеклянный фильтр № 2 для отделения трипсина, иммобилизованного на сефарозе, и измеряют прирост оптической плотности на спектрофотометре СФ-4 при 253 нм против пробы, содержащей только реактивы. Активность трипсина выражают в Е на 1 мг сухой сефарозы или 1 мл сцеженной суспензии. Е — единица активности фермента, которая соответствует количеству фермента, которое расщепляет 1 мкмоль БАЭЭ за 1 мин в стандартных условиях.

Определение антитриптической активности (АТА) ТКСТИ проводят как описано выше (1-й метод выделения).

Приготовление трипсин-сефарозы 4Б

Синтез бромциана. К раствору 5,7 мл брома в 2,5 мл воды в конической колбе прибавляют по каплям в течение 2 ч раствор 9,7 г KCN в 63 мл воды; реакцию проводят в вытяжном шкафу при постоянном перемешивании и охлаждении реакционной колбы льдом (необходима хорошая тяга!). После того как реакционная смесь становится светло-желтой, к колбе присоединяют приемник, охлаждаемый льдом (приемник должен сообщаться со склянкой Тищенко, содержащей 5 М раствор NaOH), далее BrCN возгоняют при 80—90 °С на водяной бане; выход BrCN — 9,15 г.

Активирование сефарозы. Сефарозу 4Б активируют BrCN по методу Катрекасаса (Cuatrecasas e. a., 1968): 50 мл сцеженной сефарозы 4Б суспендируют в 50 мл 0,05 М боратного буфера (pH 10); к полученной суспензии добавляют кусочки льда и от 5 до 9,5 г BrCN; pH реакционной смеси доводят до 11 с помощью 5 М раствора NaOH и поддерживают на этом уровне потенциометрическим титрованием 5 М раствором NaOH; через 10 мин активированную сефарозу промывают на стеклянном фильтре № 1 или № 2 1 л 0,1 М раствора NaHCO₃ и 2,5 л буфера А, предварительно охлажденными до 4 °С.

Получение трипсин-сефарозы 4Б. Ковалентное присоединение трипсина проводят по методу Шове и Ашера (Chauvet, Acher, 1972): к 50 мл сцеженной активированной сефарозы 4Б, суспендированной в 50 мл буфера А (общий объем 100 мл), одноактно прибавляют раствор 1 г трипсина в 16 мл того же буфера. Реакцию проводят при перемешивании при 4 °С в течение 18 ч; полученную трипсин-сефарозу 4Б промывают 2,5 л буфера А, содержащего 0,22 М NaCl, а затем — 1 л 0,1 М буфера Б до исчезновения поглощения при 280 нм у промывных вод. Трипсин-сефарозу хранят в буфере Б при 4 °С.

Определение БАЭЭ-эстеразной активности иммобилизованного трипсина описано выше. Найдено, что БАЭЭ-эстеразная активность суспензии

трипсин-сефарозы 4Б, получаемой в данных условиях, составляет 10 Е/мл сцеженной суспензии сорбента, что соответствует содержанию 0,5 мг трипсина с активностью 20 Е/мг в 1 мл сцеженной трипсин-сефарозы 4Б (в 1 мл сцеженной суспензии содержится 50—53 мг высушенной до постоянной массы сефарозы 4Б).

Получение высокоочищенного препарата ТКСТИ

1-й этап. Освобождение сыворотки крови кролика от термических ингибиторов трипсина

2 л сыворотки крови кролика, полученной как описано выше (1-й метод выделения ТКСТИ), разбавляют в 2 раза водой, подкисляют концентрированной HCl до pH 4,0 и прогревают в течение 1 ч при 55°C (табл. 23, 1-й этап). Белки сыворотки крови осаждают сухим $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; фракцию белков, полученную осаждением в зоне насыщения 0—0,30, отбрасывают; собирают фракцию, осажденную в зоне насыщения 0,30—0,55 (см. табл. 23, фракция 1б); осадок растворяют в воде; соли удаляют гельфильтрацией на колонке ($5,5 \times 150$ см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,1 М раствором HCl. При выходе с колонки собирают белковые фракции; концентрацию белка определяют спектрофотометрически (СФ-4) по поглощению растворов при 280 нм в кювете с ходом луча 1 см (поглощение, равное 1,0, соответствует содержанию белка 1 мг/мл). Белковые фракции объединяют и к полученному раствору добавляют 4 М ацетатный буфер, pH 5,0 (конечная концентрация 0,1 М), сухой NaCl и CaCl_2 до конечной концентрации 0,22 и 0,01 М соответственно. Активность ТКСТИ в полученном растворе составляет 0,064 ИЕ/мг (см. табл. 23, фракция 1г).

2-й этап. Хроматография фракции 1г на трипсин-сефарозе 4Б

На колонку ($2,2 \times 12$ см) с трипсин-сефарозой 4Б, уравновешенной буфером Б (pH 5,0), наносят раствор 41,5 г фракции 1г в том же буфере со скоростью 30—40 мл в час. При выходе с колонки в фильтрате (см.

Рис. 19. Очистка ТКСТИ при помощи биоспецифической хроматографии на колонке с трипсин-сефарозой 4Б. Колонка с трипсин-сефарозой 4Б ($2,2 \times 12$ см) уравновешена буфером Б (рН 5,0). а — элюция буфером Б (этап 2б, см. табл. 23); б — элюция 0,01 М раствором НСl, содержащим 1 М NaCl, 0,01 М CaCl₂ и 15% (по объему) изопропилового спирта (этап 2в, см. табл. 23).

На ординате — содержание белка в единицах оптической плотности при 280 нм (прерывистая линия) и удельная антитриптическая активность (АТА) в ИЕ/мг белка (крестики); на абсциссе — объем элюата в миллилитрах.

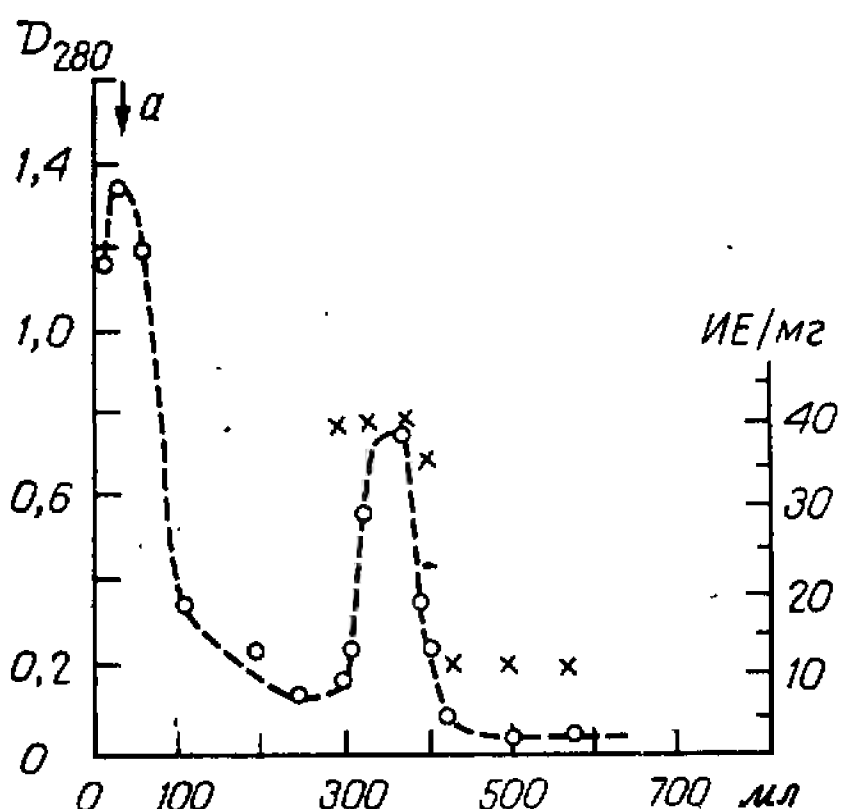


табл. 23, фракция 2а) получают белки, не сорбируемые трипсин-сефарозой 4Б. Для удаления белков, неспецифически связавшихся с сорбентом, колонку промывают буфером Б (см. табл. 23, фракция 2б; рис. 19, пик а). Для извлечения ТКСТИ из комплекса с трипсином, иммобилизованным на сефарозе 4Б, используют 1 М раствор NaCl в 0,01 М НСl (рН 2,0), содержащий 15% изопропилового спирта по объему (см. табл. 23, фракция 2в). Изопропиловый спирт способствует элюции ТКСТИ, подавляя гидрофобные взаимодействия ингибитора с фиксированным ферментом. В собираемых фракциях определяют АТА, как описано выше. Фракции, содержащие ТКСТИ (см. рис. 19, пик б) и имеющие одинаковую удельную АТА, объединяют, концентрируют на роторном испарителе при 37°С и обессоливают при помощи диализа против дистиллированной воды.

3-й этап. Гельфилтрация фракции 2г на сефадексе G-75

Гельфилтрацию фракции 2г проводят на сефадексе G-75 (элюция 0,01 М раствором ацетата аммония, рН 7,9), при этом происходит очистка ТКСТИ от незначительной примеси высокомолекулярных веществ. Коллекторные фракции, содержащие ингибитор, объединяют и лиофилизируют. Удельная АТА препарата ТКСТИ до и после

Выделение и очистка ТКСТИ из сыворотки крови кролика
при помощи биоспецифической хроматографии на трипсин-сефарозе 4Б
(2-й метод выделения)

Этап очистки	Фрак- ция	Количес- тво белка, мг	Активность ТКСТИ		Выход		Степень очистки
			ИЕ/мг	ИЕ во фракции	по белку, %	по АТА, %	
1-й. а) Сыворотка крови кролика (2 л), разбавленная в 2 раза дистилли- рованной водой	1а	120 000	0,025—0,03*	3 600	100	100	1
б) Осаждение сульфатом аммония 0,3—0,55 насыщения	1б	45 000	0,075	3 350	37,6	93	2,5
в) Гельфильтрация на сефадексе G-25, элюция 0,1 ММ НСl	1в	41 500	0,074	3 060	34,5	85	2,5
г) Подкисление фракции 1в до рН 5,0	1г	41 500	0,064	2 700	34,5	75	2,1
2-й. Хроматография фракции 1г (1,5 л) на трипсин-сефарозе 4Б:							
а) фильтрат	2а	32 300	0,01	323	27,0	9	—
б) 1-й элюат: 0,1 М натрий-ацетат- ный буфер (рН 5) с 0,22 М NaCl и 0,01 М CaCl ₂	2б	1 080	0	0	0,9	0	—

Продолжение

Этап очистки	Фракция	Количество белка, мг	Активность ТКСТИ		Выход		Степень очистки
			ИЕ/мг	ИЕ во фракции	по белку,	по АТА,	
в) 2-й элюат: 0,01 М раствор HCl с 1 М NaCl, 0,01 М CaCl ₂ и 15% изопропиловым спиртом	2в	52	39—44	1 870	0,043	52	1 300—1 700
г) Концентрирование на роторном испарителе при 37°C фракции 2в и диализ против дистиллированной воды	2г	50	39—44	1 800	0,042	50	1 300—1 700
3-й. Гельфльтрация высокоактивной фракции 2г на сефадексе G-75; 0,01 М раствор ацетата аммония (рН 7,9) и лиофилизация	3	41	42—44	1 500	0,03	42	1 400—1 700

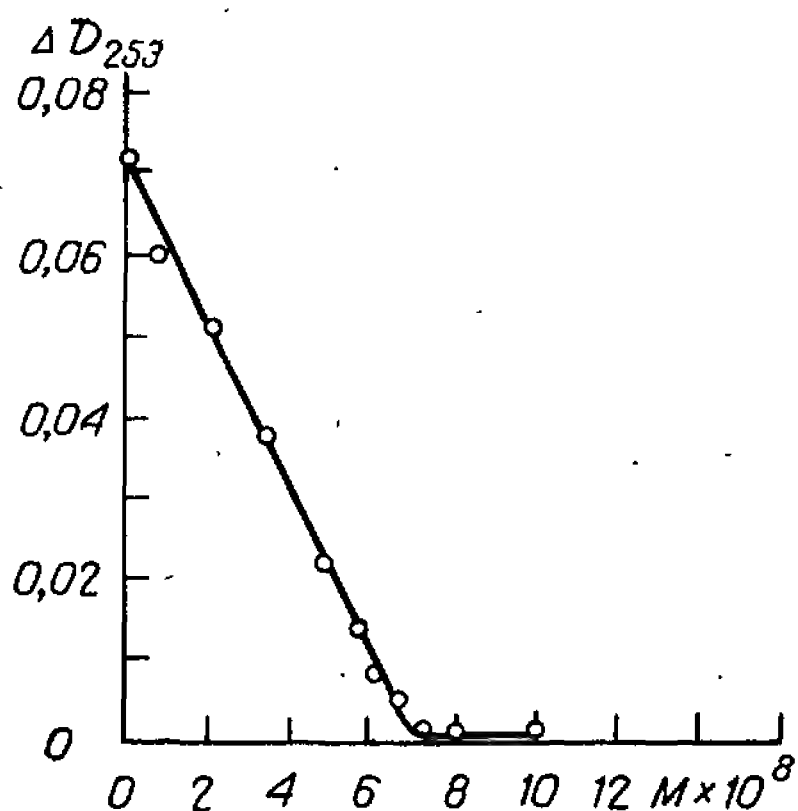


Рис. 20. Титрование трипсина ингибитором (ТКСТИ). В кювете (ход луча 1 см) спектрофотометра СФ-4 в 3 мл 0,05 М трис-НСI буфера (рН 8,0) содержится: трипсин (препарат имеет 44% активного фермента, по данным титрования трасилолом) — $7,3 \times 10^{-8}$ М в пересчете на 100% препарат; ингибитор (ТКСТИ) — от 0 до 10^{-7} М; БАЭЭ — 5×10^{-3} М.

На ординате — прирост оптической плотности при 253 нм (ΔD_{253}) по сравнению с контрольной пробой, содержащей реактивы без добавления фермента и ингибитора; ΔD_{253} соответствует скорости гидролиза БАЭЭ трипсином в присутствии различных количеств ингибитора; на абсциссе — конечные концентрации добавляемого ТКСТИ в единицах молярной концентрации (М) $\times 10^8$.

лиофилизации одинакова и равняется 42—44 ИЕ/мг, что соответствует $97 \pm 3\%$ содержания ингибитора в препарате, измеренного по титрованию трипсина раствором ТКСТИ (рис. 20) (Green, 1953).

Таким образом, 2-м методом практически в 3 приема удается очистить ингибитор в 1400—1700 раз. Выход ТКСТИ составляет 42% от АТА прогретой сыворотки крови. Метод позволяет получить из 1 л сыворотки крови кролика 25 мг высокоочищенного препарата ТКСТИ.

Оба из описанных выше методов позволяют получить препарат ТКСТИ с близкой удельной активностью (35—42 и 42—44 ИЕ/мг); однако 2-й метод, в котором используется биоспецифический сорбент, более прост и эффективен.

Выделение ТКСТИ в препаративных количествах открывает возможно-

сти для исследования его структуры. Методами химической модификации функциональных групп ингибитора нам удалось установить его принадлежность к аргининовому типу природных ингибиторов трипсина. Представляет значительный интерес изучение физиологической роли, специфичности и структурных особенностей ТКСТИ, близкого по свойствам к ингибиторам, выделенным Shulman (1955) из сыворотки крови и мочи человека, Astrup (1968) из мочи беременных женщин, Nochstrasser и соавт. (1973)* из нативной плазмы крови человека и из слизистой оболочки бронхов.

НОВЫЙ МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ

Л. П. АЛЕКСЕЕНКО

Предлагаемый микрометод определения активности протеолитических ферментов основан на измерении содержания аргинина в пептидах, освобождающихся при гидролизе протеиназами белковых субстратов. Содержание аргинина определяют с помощью стабилизированной и усовершенствованной реакции Сакагучи (Л. П. Алексеев, В. Н. Орехович, 1971), позволяющей определять содержание аргинина в растворах трихлоруксусной кислоты после осаждения и удаления нерасщепленных белков. Зная содержание аргинина в белковом субстрате и определяя его количество в перешедших в раствор пептидах, можно рассчитать процент гидролиза белкового субстрата изучаемыми протеиназами. В этом главное преимущество метода, поскольку ни метод Ансона, ни метод Кунитца (Нортроп и соавт., 1950) не дают возможности рассчитать процент гидролиза белка, атакуемого протеолитическими ферментами. Из всех существующих методов только нингидриновый метод Мура и Штейна (Moore, Stein, 1954) позволяет определить процент гидролиза белковых субстратов, но он имеет ограниченное применение, поскольку требует предварительного проведения полного кислотного гидролиза как белка-субстрата, так и образующихся пептидов.

В предлагаемом нами методе калибровочная кривая строится по растворам свободного аргинина. Введение в реакцию пептидов и белков в виде их биуретовых комплексов повысило чувствительность реакции Сакагучи с остатками аргинина и сделало ее такой же чувствительной, как и для свободного аргинина.

В качестве белковых субстратов использовали классический субстрат — гемоглобин и окисленный по Сангеру лизоцим. Этот низкомолекулярный белок, содержащий 12,7% аргинина, прекрасно расщепляется как пепсином (рвется около 30 связей), так и трипсином (освобождается 18 пептидов).

РЕАКТИВЫ

Буферные растворы: фосфатный, цитратный, ацетатный, боратный с необходимыми значениями рН.

Белковые субстраты: 1% раствор гемоглобина или окисленного лизоцима в соответствующем буфере.

Окисление лизоцима (Sanger, 1949): 1 г лизоцима растворяют в 35 мл муравьиной кислоты, к которой предварительно было добавлено 4 мл 30% раствора H_2O_2 . Смесь выдерживают 15 мин при комнатной температуре, а затем добавляют 40 мл воды. Упаривают в вакууме до 2—4 мл и осаждают 200—300 мл охлажденного ацетона.

Осадок отделяют центрифугированием, промывают ацетоном для удаления муравьиной кислоты и сушат на воздухе.

Гипобромит натрия. 1 мл брома растворяют в охлажденном 1 н. растворе NaOH . Перед употреблением гипобромит разводят в 8 раз 0,25 н. раствором NaOH .

2,4-Дихлор-1-нафтол (ДХН).

Синтез: 5 г 1-нафтола растворяют в 50 мл охлажденной ледяной уксусной кислоты и при охлаждении пропускают хлор до тех пор, пока проходящий через желтоватую жидкость газ не вызовет ее потемнения (темные облака).

Проба на 2,4-дихлор-1-нафтол: нанести на стекло несколько капель реакционной смеси, упарить досуха и растворить в нескольких каплях 2 н. раствора NaOH . Раствор не должен синеть. Посинение свидетельствует об образовании трихлоркетона в результате чрезмерного хлорирования. Если посинения нет, то уксусную кислоту упаривают до появления кристаллов и оставляют до следующего дня для кристаллизации. Перекристаллизацию ведут из ледяной уксусной кислоты. ДХН образует бесцветные иглы, мутнеющие и рассыпающиеся на воздухе; т. пл. 107—108 °С.

Исходный раствор: 0,2% раствор ДХН в абсолютном этаноле. Перед употреблением смешивают 1 часть этого раствора с 5 частями 0,25 н. раствора NaOH и двумя частями третичного бутанола.

10% раствор 2-тиодигликоля в этаноле.

2,5 мМ раствор CuSO_4 .

5 н. раствор KOH (или NaOH).

10% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Аргинин.

α -N-бензоиларгининамид (БАА), α -N-бензоиларгинин-этиловый эфир (БАЭЭ), α -N-бензоиларгининметилловый эфир (БАМЭ) и α -N-бензоиларгинин (БА).

Трипсин (кристаллический препарат, полученный в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР).

Пепсин (Олайнинский завод).

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Прежде чем приступить к серийному определению активности протеолитических ферментов в изучаемых тканевых экстрактах или биологических жидкостях, необходимо:

1. Определить зависимость величины активности фермента от pH и выбрать оптимальную реакцию среды для проявления активности изучаемого фермента.

2. Построить график зависимости активности фермента от времени его инкубации с субстратом. Выбрать для работы те сроки инкубации, при которых сохраняется линейная зависимость между величиной активности фермента и временем его инкубации.

3. Определить зависимость величины активности изучаемого фермента от концентрации белка в пробе. Выбрать такие концентрации фермента, при которых величины активности фермента были бы пропорциональны его концентрации. Кроме того, следует учитывать, что в тканевых экстрактах и биологических жидкостях могут присутствовать ингибиторы протеолитических ферментов. При разведении пробы их концентрация снижается и протеолитическая активность увеличивается. Определяя «фактор разведения», можно одновременно с подбором оптимальных условий для определения протеолитической активности выявить и наличие ингибитора.

4. При определении активности ферментов необходимо работать при постоянной скорости ферментативной реакции, достигаемой при полном насыщении фермента субстратом, при так называемой максимальной скорости ферментативной реакции. В каждом отдельном случае эту максимальную скорость необходимо найти экспериментально, измерив активность препарата при разных концентрациях субстрата, при постоянных концентрации белка и времени инкубации.

Найдя все эти условия, можно приступать к серийному определению активности протеолитических ферментов.

Определение активности протеиназ по белковым субстратам

К 0,5 мл субстрата в соответствующем буферном растворе добавляют 0,5 мл пробы, содержащей фермент (экстракт, биологическая жидкость, очищенный или полуочищенный препарат фермента), инкубируют установленное опытным путем время, после чего белки в пробе осаждают 3 мл 10% раствора ТХУ. Отделяют осадок центрифугированием, а надосадочную жидкость (ТХУ-центрифугат) подвергают дальнейшей обработке. Контрольными пробами служат пробы, к которым реактивы добавляют в обратном порядке: к 3 мл 10% раствора ТХУ добавляют 0,5 мл раствора, содержащего фермент, и 0,5 мл субстрата. Рекомендуется ставить пробу на автолиз субстрата: к 0,5 мл субстрата добавляют 0,5 мл прокипяченного раствора, содержащего фермент, инкубируют вместе с опытными пробами и осаждают ТХУ.

Определение содержания аргинина в ТХУ-центрифугатах по модифицированной реакции Сакагучи

К 0,5 мл ТХУ-центрифугата добавляют 0,5 мл 2,5 мМ раствора CuSO_4 , 0,5 мл 5 н. раствора KOH , 0,5 мл раствора ДХН. Раствор встряхивают и вносят 0,5 мл гипобромита натрия, после чего мгновенно возникает ярко-розовая окраска. Раствор энергично встряхивают и не позже чем через 20—30 с (время развития максимального окрашивания) стабилизируют пробы добавлением 0,2 мл раствора 2-тиодигликоля. Стабилизация необходима для того, чтобы предотвратить разрушение окрашенного продукта избытком гипобромита натрия.

После добавления 2-тиодигликоля в пробах как опытных, так и контрольных появляется желтоватая окраска за счет побочного продукта реакции между избытками ДХН и гипобромита натрия. Побочный продукт также стабилизируется 2-тиодигликолем. Оптическую плотность проб измеряют спектрофотометрически при 520 нм в кювете с ходом луча 1 см. Если оптическая плотность контрольных проб высока, рекомендуется как опытные, так и контрольные пробы развести, добавив по 3 мл 0,25 н. раствора NaOH .

Определение активности протеиназ по реакции с реактивом Фолина

К 0,5 мл того же ТХУ-центрифугата добавляют 0,5 мл 2,5 мМ раствора CuSO_4 , 4 мл 0,5 н. раствора NaOH и 1,5 мл разбавленного в 3 раза реактива Фолина. Через 30 мин измеряют на спектрофотметре оптическую плотность при 760 нм.

Определение активности трипсиноподобных протеиназ по синтетическим субстратам

К 0,1 мл раствора 1 мМ α -N-бензоиларгининамида (БАА) или α -N-бензоиларгининэтилового эфира (БАЭЭ) при насыщающей фермент концентрации добавляют 0,1 мл препарата фермента в буферном растворе оптимального pH. Инкубируют установленное время и, не осаждая пробы ТХУ, наносят на хроматограммы по 40—50 мкл. Ферментативную реакцию предварительно останавливают либо подкислением реакционной смеси, либо мгновенным ее замораживанием, либо погружением проб на 5 мин в кипящую водяную баню.

Хроматографию на бумаге (Ватман № 1) проводят в любой из указанных в табл. 24 систем растворителей в зависимости от субстрата, используемого в опыте. Хроматография в данном случае позволяет также выявить и количественно оценить возможное спонтанное расщепление субстрата.

Хроматограммы сушат в токе воздуха до полного испарения растворителей и обрабатывают 0,05% спиртовым раствором 1-нафтола. При просмотре таких хроматограмм в ультрафиолетовом свете α -N-бензоилпроизводные аргинина видны в виде темных пятен на флуоресцирующем фоне, создаваемом 1-нафтолом. Соответствующие участки хроматограмм вырезают, экстрагируют 3 мл 0,25 н. раствора NaOH и добавляют по 0,5 мл рабочего раствора гипобромита натрия. Развившееся ярко-розовое окрашивание стабилизируют добавлением через 20—30 с 0,2 мл 10% раствора 2-тиодигликоля в 0,25 н. растворе NaOH . К пробам добавляют по 3 мл 0,25 н. раствора NaOH и измеряют оптическую плотность при 520 нм. Оптическая плотность контрольных проб, измеренная против воды, не превышает 0,030.

Таблица 24

Результаты хроматографии на бумаге α -N-бензоиларгинина, α -N-бензоиларгининамида и α -N-бензоиларгининметилового или этилового эфиров

Система растворителей	Соотноше- ние ком- понентов	Значения Rf			
		БАА	БАМЭ	БАЭЭ	БА
2-бутанол — 85% муравьиная кислота	3:1	0,70	0,90	—	0,86
2-бутанол—изопропанол—вода	2:2:1	0,75	0,86	—	0,79
2-бутанол — пропанол — вода	2:2:1	0,66	0,82	—	0,71
2-бутанол — изопропанол — 85% муравьиная кислота	2:2:1	0,73	0,88	—	0,83
2-бутанол — пропанол — 85% муравьиная кислота	2:2:1	0,67	0,80	—	0,75
Те же компоненты	1:3:1	0,70	0,88	0,90	0,81
» » »	1:5:1	0,58	0,72	0,74	0,90
2-бутанол — пропанол — 85% муравьиная кислота — этанол	1:3:1:1	0,69	0,82	0,88	0,79
2-бутанол — пропанол — 85% муравьиная кислота — этанол — этиленхлоргидрин	1:3:1:1:1	0,67	0,79	0,81	0,70
2-бутанол — пропанол — этанол — этиленхлоргидрин (двойной фронт)	1:3:1:1	0,48	0,62	0,66	0,48
Пропанол — 85% муравьиная кислота	4:1	0,62	—	0,90	0,79
Пропанол — этанол	3:1	0,55	—	0,77	0,53
2-Бутанол — пропанол — этанол	1:3:1	0,23	—	0,60	0,23
н. Бутанол — ледяная уксусная кислота — вода	4:1:5	0,52	—	0,89	0,76
Бензиловый спирт — 85% муравьиная кислота — вода	50:5:1	0,40	0,65	—	0,53
2-Бутанол — 85% муравьиная кислота — бензиловый спирт	20:10:15	0,55	0,79	—	0,67

Калибровочные кривые

Калибровочные кривые по пепсиновому гидролизату окисленного лизоцима

30 мг окисленного лизоцима растворяют в 50 мл подкисленной воды (40 мл H_2O + 10 мл 0,3 н. раствора HCl) и к полученному раствору добавляют 0,5 мг пепсина. Смесь оставляют при комнатной температуре на сутки. По истечении этого срока инкубации препарат не дает осадка с ТХУ. Этот препарат используют наряду с рас-

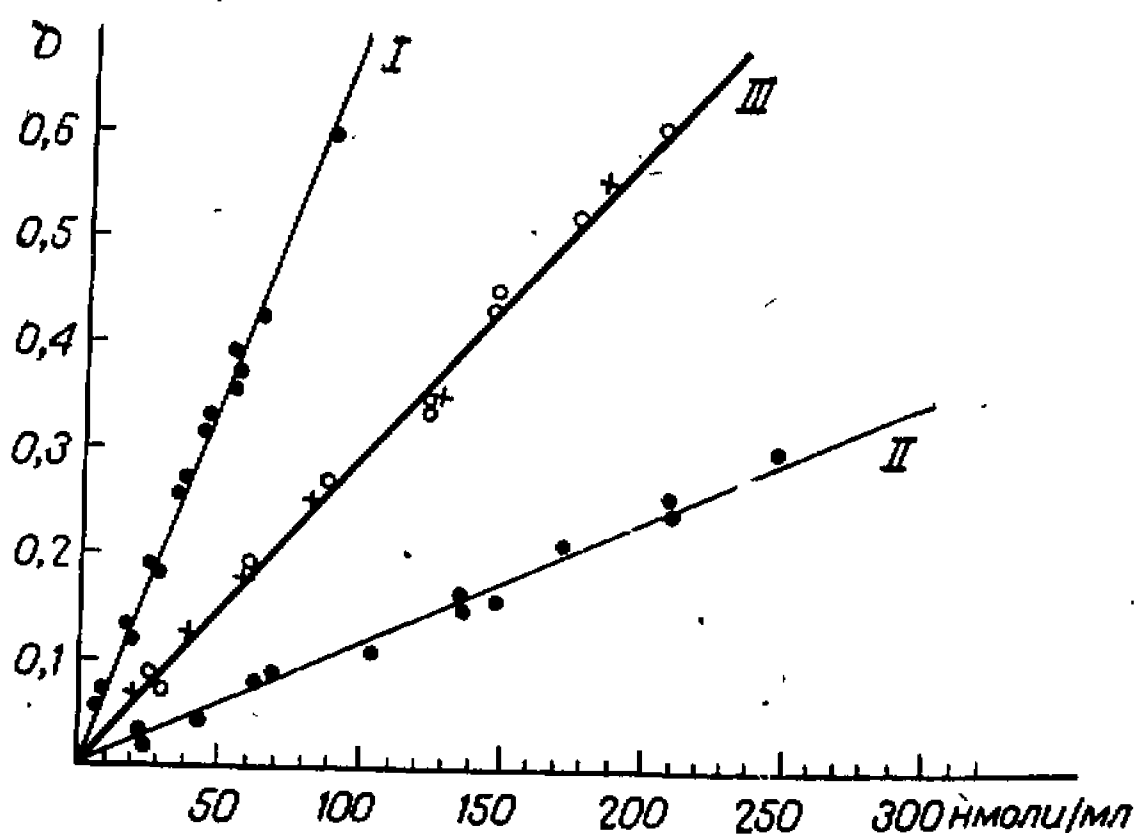


Рис. 21. Калибровочные кривые. *III* получена с помощью микрометода на основе реакции Сакагучи (520 нм) по растворам аргинина (точки обозначены крестиками) и по пептидному гидролизату лизоцима (точки обозначены кружками); *I* и *II* — с помощью реакции Фолина (760 нм); *II* — по растворам тирозина; *I* — по пептидному гидролизату лизоцима.

На ординате — оптическая плотность пробы; на абсциссе — количество аминокислоты или ее остатка в гидролизате в наномолях на 1 мл.

творами аргинина и тирозина в качестве стандарта для построения калибровочных кривых. Приготавливают разведения с содержанием от 60 до 600 мкг/мл исходного лизоцима. В пробы вводят соответствующее опытным пробам количество ТХУ. Приготавливают также растворы свободных аргинина и тирозина с концентрацией от 0,04 до 0,25 мкмоль/мл. Из каждой пробы берут по 0,5 мл (в трех параллельных пробах) для определения содержания аргинина и тирозина по Фолину.

Калибровочные кривые, полученные по пепсиновому гидролизату лизоцима и растворам аргинина и тирозина, представлены на рис. 21. Значения оптической плотности проб, измеренные при 520 или 760 нм, нанесены на график против концентрации аргинина или тирозина или их остатков в пепсиновом гидролизате лизоцима. Кривая *I*, полученная при взаимодействии реактива Фолина с пепсиновым гидролизатом лизоцима, проходит значительно выше кривой *II*, полученной при реакции реактива Фолина с растворами тирозина эквивалентных концентраций.

Кривая *III* получена в результате реакции Сакагучи как со свободным аргинином, так и с его остатками, содержащимися в пептидах пепсинового гидролизата лизоцима. Точки точно ложатся на одну прямую. Это свидетельствует о том, что в гидролизате, осажденном ТХУ, весь аргинин полностью реагирует с реактивом Сакагучи. Взаимодействие реактива Фолина с тирозином не специфично. Кроме тирозина, в пептидах с реактивом Фолина реагируют триптофан, цистеин и, возможно, некоторые другие остатки аминокислот. Образующие медью с тетрапептидами и полипептидами биуретовые комплексы облегчают такое взаимодействие. Следовательно, выражать величину активности протеолитических ферментов в «тирозиновых эквивалентах» по Фолину, как это иногда делают, неправильно.

Калибровочные кривые по растворам БАМЭ, БАА, БАЭЭ и БА

На хроматографическую бумагу наносят по 0,04—0,3 мкмоль синтетических субстратов трипсина и производят хроматографию в системах растворителей н. бута-

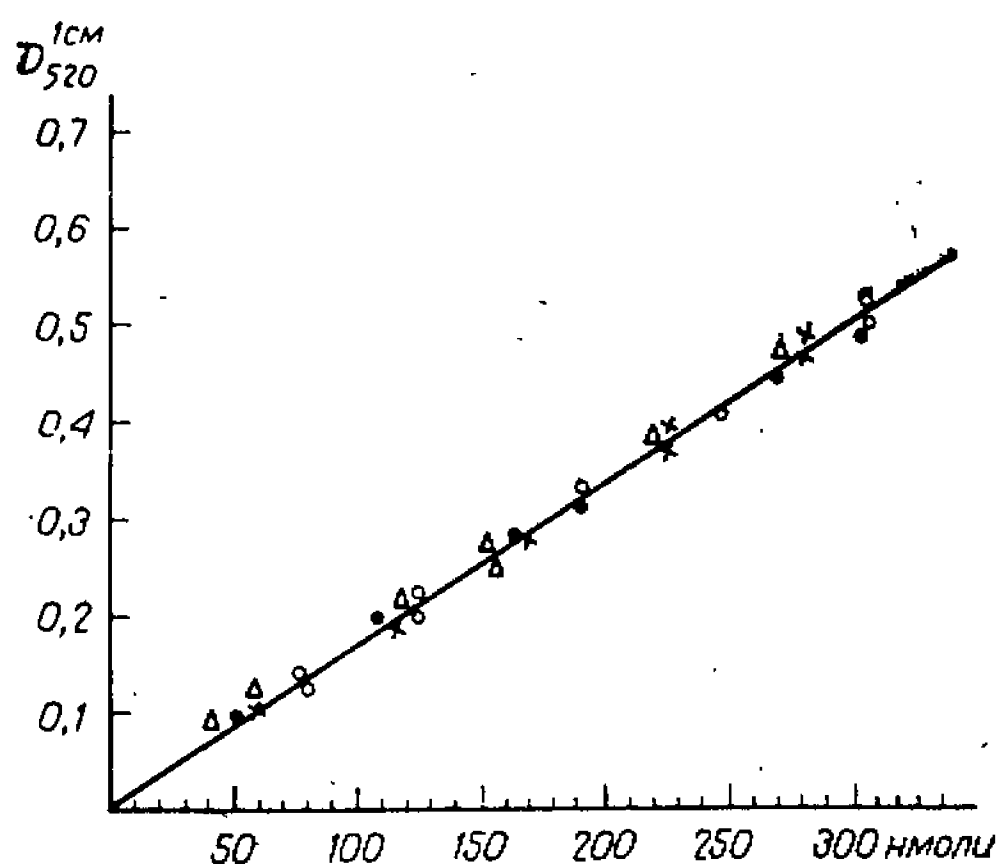


Рис. 22. Калибровочная кривая получена с помощью хроматографического микрометода на основе реакции Сакагучи по синтетическим субстратам трипсина и растворам аргинина.

Крестики — БАЭЭ; кружки — БАА; треугольники — БА; точки — аргинин.

На ординате — оптическая плотность при 520 нм; на абсциссе — количество вещества, нанесенное на хроматограмму в наномолях.

нол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5) или 2-бутанол—пропанол—85% муравьиная кислота (1 : 5 : 1). Далее определяют содержание разделенных компонентов по реакции Сакагучи вышеописанным способом.

Калибровочная кривая, полученная по реакции Сакагучи с синтетическими субстратами, представлена на рис. 22. Прямо пропорциональная зависимость между количеством вещества и оптической плотностью имеет место в пределах 50—300 нмоль. Все точки, соответствующие БАА, БА и БАЭЭ, ложатся на одну прямую.

* * *

В серии опытов по определению влияния различных веществ на реакцию Сакагучи было найдено, что реактивы, обычно используемые для приготовления буферных растворов — фосфаты, цитрат, тетраборат натрия (бура), барбитал-натрий (мединал), пиридин — не угнетают реакцию Сакагучи и могут быть использованы при определении протеолитической активности. Но трис-буфер полностью тормозит реакцию Сакагучи, следовательно, его применение исключается.

Перед определением протеолитической активности из проб необходимо также полностью удалять сульфат аммония, мочевины, гуанидин, глиоксаль, тиосульфат, мертиолат, фенол, сахарозу в тех случаях, когда эти соединения присутствуют в экстрактах по условиям эксперимента. Трихлоруксусная кислота не угнетает реакцию Сакагучи. Не тормозит ее, по нашим данным, и присутствие свободных аминокислот.

В табл. 25 приведены данные, полученные описанным «аргининовым» микрометодом, по активности пепсина и трипсина по трем различным белковым субстратам — окисленному лизоциму, гемоглобину и сывороточному альбумину человека. Последние два белка перед опытом денатурировали нагреванием при 95 °С в течение 30 мин. Расщепление белков пепсином проводили при рН 2, а расщепление трипсином — при рН 8,5.

Необходимо оговориться, что расщепление белков представляет собой сложный процесс, который может быть описан реакциями различного типа. Скорость расщепления различных пептидных связей различна и определяется природой боковых цепей аминокислотных остатков, вторичной и третичной структурой молекулы

Активность пепсина и трипсина по трем различным белковым субстратам, полученная с помощью «аргининового» микрометода

Расщепляемый белок	Пепсин			Трипсин		
	Лизоцим (отн. мол. масса 14300, окисленный)	Гемоглобин (отн. мол. масса 65 000)	Сывороточный альбумин человека (отн. мол. масса 70 000, денатурированный)	Лизоцим (отн. мол. масса 14300, окисленный)	Гемоглобин (отн. мол. масса 65 000, денатурированный)	Сывороточный альбумин человека (отн. мол. масса 70 000, денатурированный)
	1:900	1:500	1:476	1:1700	1:100	1:70
	22 (за 5 мин)	22 (за 7 мин)	5 (за 10 мин)	12 (за 10 мин)	7 (за 10 мин)	13 (за 10 мин)
	33	31	5	11,5	1,75	1,56
Фермент — субстратное отношение						
Расщепление субстрата, %	2,3	0,5	0,07	0,9	0,03	0,03
Скорость гидролиза субстрата:	76,6	16,6	2,3	22,5	0,75	0,5
а) мг белка/мг фермента/мин						
б) моль субстрата/мг фермента/мин						
в) моль субстрата/моль фермента/мин						

белка и размером образующихся пептидных фрагментов (Mihalyi, Codfrey, 1963). Поэтому определение скорости гидролиза белков под действием протеолитических ферментов лишь относительные величины.

ХРОМАТОГРАФИЯ ПО СРОДСТВУ (БИОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ)

О. В. КАЗАКОВА

В отличие от классических лабораторных методов очистки и разделения белков, основанных на незначительных различиях физико-химических свойств макромолекул, очистка ферментов и других биологически активных веществ с помощью хроматографии по сродству основана на биологически специфических, обратимых взаимодействиях. Создание и применение избирательных сорбентов получило в последние годы чрезвычайно широкое развитие в различных областях биохимии: в энзимологии и иммунологии, в химии нуклеиновых кислот и гормонов (Cuatrecasas, Anfinsen, 1971a, b).

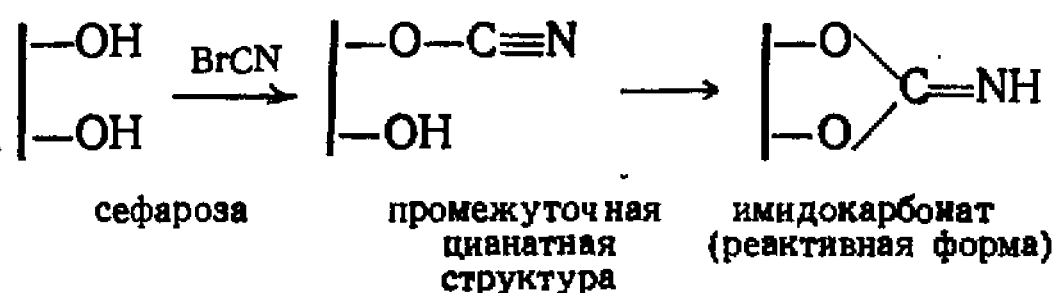
Хроматографию по сродству обычно применяют для очистки одного компонента системы, состоящей из двух или более взаимодействующих веществ. Основной принцип заключается в прикреплении одного компонента к нерастворимой пористой матрице (иммобилизация). Связанный компонент (лиганд) может быть использован для специфической сорбции другого компонента в условиях, благоприятных для их взаимодействия и образования комплекса. Элюция сорбированного вещества может включать любую процедуру, ведущую к диссоциации комплекса. Для очистки ферментов чаще всего используют конкурентные ингибиторы, связанные с носителями. В качестве лигандов могут быть взяты также кофакторы, субстраты или фрагменты субстратов. В иммунологии хроматографию по сродству широко применяют для очистки антител на связанных антигенах и для выделения антигенов на связанных антителах. Метод с успехом используют для выделения белков-рецепторов, связывающих витамины и гормоны. Хроматографию по сродству применяют также для концентрирования разбавленных белковых растворов, удаления денатурированных или модифицированных ферментов из активных препара-

тов, для отделения ферментов от неактивных предшественников. Большие преимущества данного метода перед известными ранее методами препаративной химии белков заключаются в том, что хроматография по сродству представляет обычно быструю одноступенчатую процедуру, причем выделяемые биополимеры претерпевают минимальные денатурационные изменения, так как во время очистки их активные центры стабилизированы связанным лигандом.

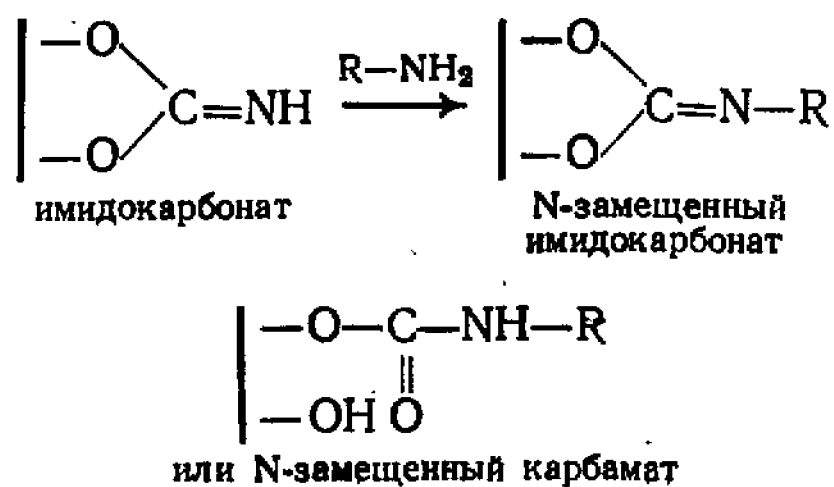
Для получения специфических сорбентов используют носители полисахаридной природы: агарозу, сефарозу, различные сефадексы, а также полиакриламидные гели и пористые стеклянные поверхности. Чаще всего применяют сефарозу благодаря ее пористой структуре, обеспечивающей хороший ток жидкости и проходимость для макромолекул, и почти полному отсутствию неспецифической сорбции. Химические группы сефарозы, будучи активированы бромцианом, могут связывать в мягких условиях различные лиганды, содержащие аминокгруппы (схема V). Активированная сефароза стабильна по отношению к изменениям pH, температуры, ионной силы растворов, а также к действию денатурирующих агентов — мочевины и гуанидинхлорида.

Схема V

Активация сефарозы



Прикрепление к активированной сефарозе лиганда, имеющего аминокгруппы:



ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВИРОВАННОЙ СЕФАРОЗЫ

Сцеженный осадок сефарозы суспендируют в равном объеме воды, к суспензии добавляют BrCN из расчета 250 мг на 1 мл осадка сефарозы. Затем рН смеси доводят до 11,0 2 М раствором NaOH . Реакция длится 8—12 мин, в течение которых в смеси поддерживают рН 11,0, приливая раствор NaOH по каплям. В смесь добавляют небольшие кусочки льда, чтобы избежать разогревания. По окончании реакции смесь охлаждают до 5°C добавлением льда и промывают на воронке Бюхнера 30-кратным объемом буферного раствора, в котором будет проводиться присоединение лиганда. Сразу же после активации добавляют раствор лиганда. Реакцию присоединения ведут в течение 16—20 ч при 4°C и перемешивании магнитной мешалкой. Вращение должно быть медленным, чтобы не повредить частицы геля. Емкость активированной сефарозы варьирует по отношению к различным лигандам. При связывании белков удается получить до 95% белка в виде нерастворимого производного. При связывании низкомолекулярных соединений следует брать в 10 раз больше лиганда по сравнению с тем количеством, которое хотят получить в связанном виде. рН смеси при реакции присоединения лиганда может варьировать от 8,0 до 11,0. Чем щелочнее рН среды, тем полнее и легче идет реакция. Активированная в лабораторных условиях сефароза нестабильна, поэтому процесс ее отмывки и добавления лиганда не должен превышать 90—120 с. В настоящее время фирма «Pharmacia» выпускает коммерческий препарат активированной сефарозы, обладающий высокой стабильностью.

Емкость специфического сорбента проверяют по способности сорбировать белок, обладающий специфическим сродством к лиганду.

Специфический сорбент помещают обычно в небольшую колонку (1—2×8—10 см), уравновешенную буферным раствором, оптимальным для проявления биологической активности белка, который будет нанесен. Белковый раствор пропускают через колонку в том же буфере, обеспечивающим наилучшее связывание с лигандом. Элюцию проводят в условиях, вызывающих диссоциацию комплекса белок—лиганд. Специфически связанный белок часто удается элюировать изменением рН буфера

и его ионной силы; при более сильных взаимодействиях белка с лигандом необходимо добавлять мочевины или гуанидинхлорид. Правильно подобранный элюирующий раствор должен резко уменьшать сродство белка к лиганду, не вызывая при этом денатурационных изменений в молекуле белка. Иногда для элюции применяют раствор конкурентного ингибитора, более сильного, чем тот, который использовали для синтеза сорбента. И, наконец, существуют методы, позволяющие специфически разрывать связь между матрицей и лигандом и получать комплекс лиганд—белок.

Пример 1. Выделение овомукоида путем сорбции на нерастворимом производном трипсина (Beeley, McCargins, 1972).

Трипсин, ковалентно связанный с сефадексом G-200, использовали для выделения ингибитора трипсина гликопротеида овомукоида из яичного белка и яйцеводов кур. G-200-трипсин получали путем реакции 10 г активированного бромцианом сефадекса (800 мл суспензии) с 1,5 г кристаллического трипсина. Для выделения овомукоида брали раствор яичного белка или экстракт яйцеводов кур. Белковые растворы центрифугировали при 600 g 10 мин и доводили pH до 7,0. Затем к белковому раствору добавляли равный объем густой суспензии G-200-трипсина и неадсорбированные белки отмывали с помощью центрифугирования 5-кратным объемом 0,1 М раствора Na_2HPO_4 , pH 7,0 (трижды), 0,5 М раствором NaCl (трижды) и дистиллированной водой (трижды). Овомукоид элюировали с G-200-трипсина двумя объемами 0,1 н. раствора HCl (pH 1,5) при центрифугировании. Процедуру повторяли дважды. Кислые растворы объединяли, доводили pH до 4,6 добавлением раствора NaOH , диализовали 2 сут против воды и лиофилизировали. Выход овомукоида составлял 1 мг на мл суспензии G-200-трипсина.

Пример 2. Выделение бактериальной щелочной протеиназы на колонке с овоингибитор-сефарозой (Feinstein, Gertler, 1973).

Щелочная трипсиноподобная протеиназа из *Aspergillus oryzae* была выделена в одну стадию на колонке с овоингибитором трипсина, ковалентно связанным с сефарозой 4Б. 45 г грубого препарата *A. oryzae* растворяли в 900 мл 0,1 М буфера триэтанол- HCl (pH 8,0) и центрифугировали при 9000 g 15 мин. Прозрачный центри-

фугат пропускали через колонку (3×8 см) с овоингибитор-сефарозой, предварительно уравновешенной тем же буфером, промывали колонку 700 мл того же буфера, после чего адсорбированную протеиназу снимали 0,2 М раствором уксусной кислоты. Скорость тока жидкости составляла 50 мл в час. Активность протеиназы определяли по расщеплению бензоиларгининэтилового эфира. Пробы, содержащие фермент, диализовали и лиофилизировали. Было получено 30 мг гомогенного препарата фермента. Удельная активность его была повышена в 300 раз. Очищенный препарат содержал 55% активности исходного препарата.

ПРОИЗВОДНЫЕ СЕФАРОЗЫ

Для того чтобы сделать сефарозную матрицу более универсальной и способной присоединять лиганды, не обладающие аминогруппой, был разработан ряд методов получения различных производных сефарозы.

ω-Аминоалкил-сефароза

Наибольшее распространение получила ω-аминоалкил-сефароза, продукт присоединения алифатических диаминов с различной длиной цепи к активированной бромцианом сефарозе. Полученные производные содержат аминогруппы, к которым при помощи карбодиимида можно присоединять лиганды, имеющие свободный карбоксил (схема VI). Кроме того, если лиганд является

Схема VI

Прикрепление лиганда по карбоксилу к ω-аминоалкилсефарозе



низкомолекулярным соединением, прикрепление его непосредственно к матрице не обеспечивает нужных пространственных условий для взаимодействия с белком. Емкость носителя в таких случаях очень мала из-за того, что макромолекулам белка затруднен доступ к молекулам лиганда. Прикрепление лиганда к матрице на гибкой «ножке» из углеводородной цепи облегчает взаи-

модействие белка с лигандом и значительно увеличивает емкость носителя.

Пример 3. Выделение катепсина D на колонке с пепстатином, ковалентно связанным с аминоексил-сефарозой 4Б (О. В. Казакова, В. Н. Орехович, 1975; Corvol *et al.*, 1973).

Для получения аминоексил-сефарозы 10 мл сцеженного осадка активированной сефарозы 4Б промывали 1 М раствором HCl и добавляли к гелю равный объем 2 М раствора гексаметилендиамина, предварительно оттитрованного 6 М раствором HCl до pH 10,1. Реакцию проводили при комнатной температуре и медленном вращении магнитной мешалки в течение 3 ч. Аминоексил-сефарозу промывали большим количеством воды на стеклянном фильтре. Далее использовали пепстатин — антибиотик пептидной природы, имеющий следующую структуру: изовалерил-L-вал-L-вал-4-амино-3-окси-6-метилгептаноил-L-ала-4-амино-3-окси-6-метилгептаноил-Na, и являющийся конкурентным ингибитором пепсина и катепсинов группы D.

20 мг пепстатина растворяли в 2 мл диметилформамида и добавляли 2 эквивалента оксисукцинимиды; 2 эквивалента дициклогексилкарбодиимиды растворяли в 0,5 мл диметилформамида; растворы охлаждали до 4 °C, сливали и оставляли на холоду 1 ч. Реакцию продолжали 3 ч при комнатной температуре и слабом перемешивании. К реакционной смеси добавляли осадок аминоексил-сефарозы, вносили 2 мл диметилформамида, чтобы сделать суспензию более жидкой, и оставляли смесь на ночь при 18 °C и перемешивании магнитной мешалкой. Затем из реакционной смеси отсасывали всю жидкость и осадок дважды промывали небольшими объемами диметилформамида, смесью равных объемов диоксана и диметилформамида и большим количеством воды. Несвязавшийся пепстатин определяли по способности тормозить протеолитическую активность кристаллического пепсина. В данных условиях опыта с носителем связывалось около 15 мг пепстатина.

Носитель помещали в колонку (8×80 мм), промывали водой и 0,1 М цитратным буфером (pH 3,9). 250 мг белка ацетоновой фракции экстракта печени крысы наносили на колонку в 0,05 М цитратном буфере (pH 3,9). Промывали колонку тем же буфером, затем 0,5 М раствором NaCl, подкисленным до pH 3,5, для удаления не-

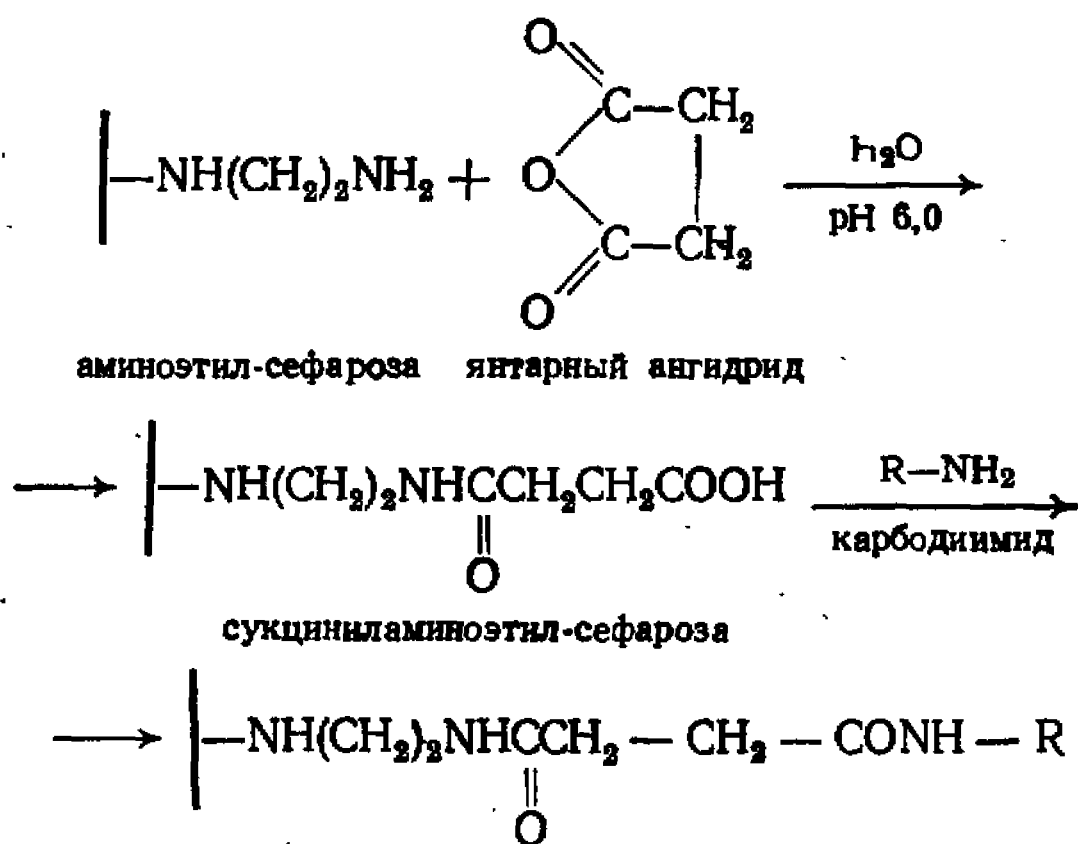
специфически сорбированных белков, и катепсин D элюировали щелочным солевым раствором 0,5 М NaCl в 0,1 М Na₂HCO₃. Было получено 3 мг препарата фермента, имеющего удельную активность, увеличенную в 60 раз по сравнению с удельной активностью ацетоновой фракции и составляющую около 70% суммарной активности.

Сукциниламиноэтил-сефароза

Для прикрепления к носителю низкомолекулярных лигандов, содержащих первичные аминогруппы, обычно применяют сукциниламиноэтил-сефарозу. В этом случае присоединение лиганда проводят по свободным карбоксилам с помощью карбодиимида (схема VII).

Схема VII

Получение сукциниламиноэтилсефарозы и прикрепление лиганда



К сцеженному осадку аминоэтил-сефарозы добавляют янтарный ангидрид из расчета 1 ммоль на 1 мл осадка. Реакцию ведут при 4 °С; pH смеси поддерживают равным 6,0, добавляя по каплям 20% раствор NaOH. Когда pH стабилизируется, смесь оставляют на 5 ч при 4 °С. Полноту взаимодействия определяют по цветной реакции аминогрупп с тринитробензолсульфокислотой (ТНБС). Лиганд, содержащий первичную аминогруппу, присоединяют при pH 5,0 в присутствии карбодиимида.

Другие производные сефарозы

Для выделения белков, содержащих сульфгидрильные группы, применяют ртутьорганические производные сефарозы. Для этого к аминоэтил-сефарозе присоединяют п-хлормеркурибензоат следующим способом. К 35 мл осадка аминоэтил-сефарозы добавляют 60 мл 40% раствора диметилформамида и в суспензию вносят 2 ммоль п-хлормеркурибензоата натрия, рН смеси доводят до 4,8 и добавляют 5 ммоль 1-этил-3-/3-диметиламинопропил/карбодиимида. В течение 1 ч смесь титруют 0,1 М раствором NaOH, поддерживая рН 4,8, затем оставляют смесь при комнатной температуре на 18 ч. Образовавшееся производное отмывают 4 л 0,1 М раствора NaHCO_3 на протяжении 8 ч. Полученный сорбент может связывать 40—50 мг гемоглобина на 1 мл сцеженного осадка сорбента. Для элюции с данного сорбента белков, содержащих сульфгидрильные группы, обычно используют 50 мМ раствор дитиотреитола или цистеина.

Если необходимо прикрепить к сефарозному носителю лиганд, имеющий фенольную или имидазольную группу, используют бромацетил-сефарозу, которую получают, обрабатывая аминоэтил-сефарозу раствором о-бромацетилноксисукцинимидом в диоксане в присутствии дициклогексилкарбодиимида. Это производное сефарозы легко присоединяет белки и реагирует также с первичными алифатическими и ароматическими аминами.

Лиганды, содержащие алифатический гидроксил, могут быть прикреплены с помощью карбодиимида к производным сефарозы, содержащим свободные карбоксильные группы.

Метод хроматографии по сродству продолжает бурно развиваться и его возможности далеко не исчерпываются приведенными здесь примерами. Принцип биоспецифической хроматографии уже начали использовать для выделения таких сложных образований, как полирибосомные комплексы, функциональные мембранные структуры и мультиферментные комплексы.

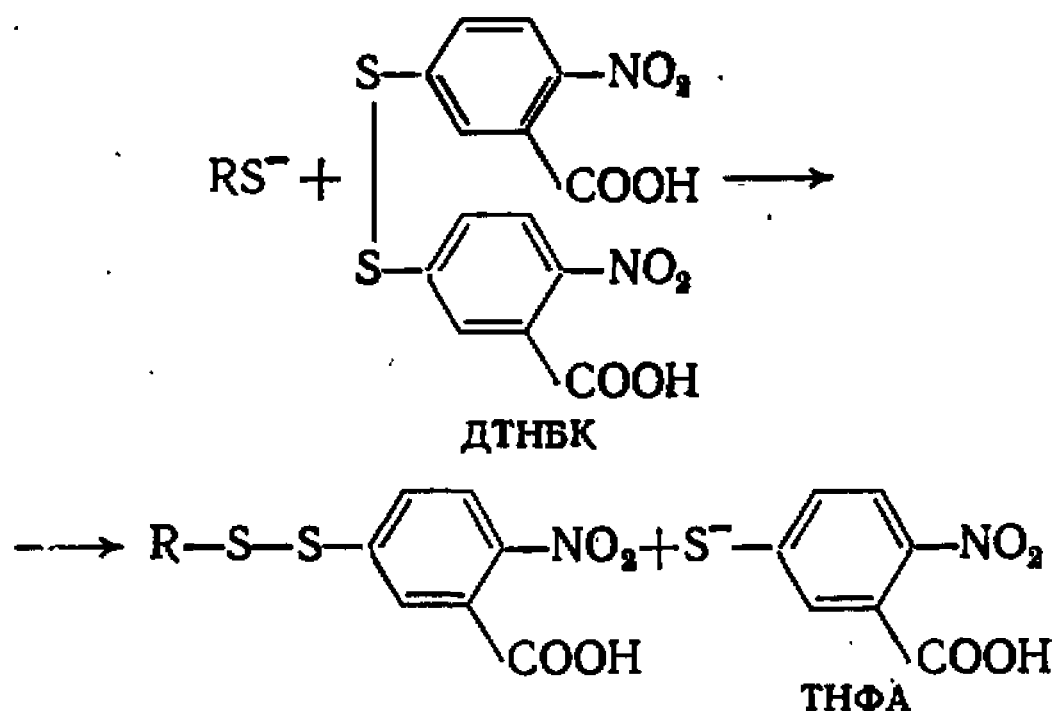
КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ SH-групп и —S—S—СВЯЗЕЙ В БЕЛКАХ ПРИ ПОМОЩИ 5,5'-ДИТИБИС (2-НИТРОБЕНЗОЙНОЙ) КИСЛОТЫ

И. В. ВЕРЕВКИНА, А. И. ТОЧИЛКИН,
Н. А. ПОПОВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП В БЕЛКАХ

Принцип метода

Взаимодействие 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной) кислоты (ДТНБК) (Ellman, 1959) со свободными SH-группами белков происходит по следующей реакции:



В процессе этой реакции, протекающей при pH 8,0, происходит освобождение тионитрофенильного аниона (ТНФА). Количество образовавшегося ТНФА прямо пропорционально количеству свободных SH-групп белков, прореагировавших с ДТНБК. Коэффициент молярной экстинкции ТНФА при 412 нм равен 11 400 (Rohyt e. a., 1971).

Реактивы

Реактив Элмана (39,6 мг ДТНБК в 10 мл 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,0).

0,2 М калий-натрий-фосфатный буфер (pH 8,0).

Синтез 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты

Принцип. м-Хлорбензальдегид, полученный из м-нитробензальдегида, нитрованием превращают в 2-нитро-5-хлорбензальдегид, последний окисляют водным раствором перманганата калия до 2-нитро-5-хлорбензойной кислоты. Взаимодействие 2-нитро-5-хлорбензойной кислоты с сульфитом натрия и последующее окисление образующейся 2-нитро-5-меркаптобензойной кислоты йодом приводят к получению 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты.

1-я стадия. Получение м-хлорбензальдегида. Реакцию проводят в четырехгорлой круглодонной колбе емкостью 1 л, снабженной механической мешалкой, обратным холодильником, капельной воронкой и термометром. В колбу помещают 50 г м-нитробензальдегида, приливают 252 мл концентрированной соляной кислоты и небольшими порциями при перемешивании вносят 225 г хлорида олова ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Поскольку реакция идет с разогреванием, реакционную смесь охлаждают в бане со льдом и поваренной солью. После прибавления всего количества хлорида олова получается густая масса желто-оранжевого цвета. Ее разбавляют 50 мл воды и при температуре от 0 до -2°C (охлаждение во льду с солью) при перемешивании медленно прибавляют из капельной воронки раствор 23 г нитрита натрия в 90 мл воды. Полученную смесь осторожно (вспенивание вследствие выделения азота) выливают при перемешивании в подогретый до кипения раствор хлорида одновалентной меди в соляной кислоте*, находящийся в химическом стакане емкостью 1,5—2 л. Реакционную смесь, которая имеет темно-коричневый цвет, перегоняют с водяным паром до получения 1—1,5 л дистиллата. Дистиллат переносят в делительную воронку, нижний слой (желтоватое масло) отделяют, а верхний слой экстрагируют эфиром, 2 раза по 100 мл. Эфирный экстракт объединяют

* 104 г сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и 89 г хлорида натрия растворяют в 350 мл воды при нагревании ($70-80^\circ\text{C}$). К горячему раствору приливают раствор 23 г метабисульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) и 14 г едкого натра в 150 мл воды, выпавший осадок хлорида одновалентной меди отделяют декантацией, промывают водой (также с декантацией) и растворяют в смеси 180 мл концентрированной соляной кислоты и 50 мл воды.

с отделенным маслом и сушат добавлением 10—15 г безводного хлорида кальция. Эфир из экстракта отгоняют на водяной бане (в колбе с прямым холодильником или на роторном испарителе), а остаток перегоняют под вакуумом водоструйного насоса. Выход м-хлорбензальдегида 19,5 г (45% от теоретического), т. кип. 107—109 °С при остаточном давлении 26 мм рт. столба.

2-я стадия. Получение 2-нитро-5-хлорбензальдегида. Нитрование проводят в четырехгорлой круглодонной колбе емкостью 300 мл, снабженной мешалкой, термометром, обратным воздушным холодильником и капельной воронкой.

В колбу помещают 142 мл концентрированной серной кислоты, хорошо охлаждают во льду с солью (до —5 °С) и при размешивании вносят небольшими порциями (через загрузочную воронку) 14,3 г сухого нитрата калия. Затем из капельной воронки постепенно приливают 14,5 г м-хлорбензальдегида при температуре от 0 до —5 °С. Перемешивают в течение 2 ч при 0 °С и еще 1 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь выливают на измельченный лед и полученную суспензию оставляют на ночь в холодильнике. Осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают холодной водой до отсутствия кислой реакции и сушат в вакуум-эксикаторе над фосфорным ангидридом. Выход 2-нитро-5-хлорбензальдегида 24,9 г (почти количественный), т. пл. 69 °С. Продукт используют для следующей стадии без очистки.

3-я стадия. Получение 2-нитро-5-хлорбензойной кислоты. Окисление проводят в трехгорлой круглодонной колбе емкостью 1 л, снабженной мешалкой, обратным водяным холодильником и капельной воронкой. В колбу наливают 360 мл воды, прибавляют 24,9 г 2-нитро-5-хлорбензальдегида, нагревают и перемешивают. К расплавленному альдегиду (температура около 70 °С) добавляют 5% водный раствор перманганата калия до полноты окисления, которую контролируют по окрашиванию фильтровальной бумаги при нанесении на нее капли реакционной смеси. При законченном окислении влажное кольцо вокруг центрального пятна двуокиси марганца окрашено в красноватый цвет, при неполном же окислении почти бесцветно. Горячую реакционную смесь отфильтровывают на воронке Бюхнера от двуокиси марганца, фильтрат (ярко-желтого цвета) подкисляют

соляной кислотой и оставляют на ночь в холодильнике. Осадок отсасывают на воронке Бюхнера, промывают холодной водой и сушат в вакуум-эксикаторе. Получают 19,3 г 2-нитро-5-хлорбензойной кислоты с т. пл. 124—129 °С. Маточный раствор экстрагируют эфиром в делительной воронке, эфирный экстракт сушат безводным сульфатом натрия, а эфир отгоняют, в результате чего получают дополнительно 3,8 г 2-нитро-5-хлорбензойной кислоты. Общий выход ее составляет 86% от теоретического. Для очистки 2-нитро-5-хлорбензойную кислоту перекристаллизовывают из толуола.

Полученную 2-нитро-5-хлорбензойную кислоту (т. пл. 136 °С) подвергают дальнейшей переработке.

4-я стадия. Получение 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты. В колбу вносят 6 г 2-нитро-5-хлорбензойной кислоты, приливают 150 мл воды и при перемешивании добавляют из капельной воронки по каплям 20% водный раствор едкого натра до pH 7,2 (по индикаторной бумаге «Рифан»). При этом pH вся кислота растворяется. Через капельную воронку вводят раствор 7,4 г кристаллического сульфида натрия ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) в 30 мл воды. Полученный раствор выдерживают в течение 2 ч при 50 °С и к нему при перемешивании прибавляют по каплям раствор йода в йодистом калии (4 г I_2 в 100 мл раствора KI). Окисление ведут до тех пор, пока оранжево-желтая окраска реакционного раствора, обусловленная анионом тиофенолята, не сменится светло-желтой (дисульфид). Реакционный раствор подкисляют 100 мл соляной кислоты (1 : 1). Выпадает масло, быстро кристаллизующееся при перемешивании. Вещество отсасывают, промывают водой и сушат в вакуум-эксикаторе. Выход 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной) кислоты 4,9 г (41,5% теоретического); кристаллы полученного вещества имеют коричневатый оттенок.

Для очистки кислоту дважды перекристаллизовывают из ледяной уксусной кислоты, после чего она получается в виде бледно-желтого кристаллического порошка с т. пл. 237—238 °С (с разложением). Эквивалент нейтрализации: вычислено 198, найдено 190.

Для определения эквивалента нейтрализации навеску 5-5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты растворяют при нагревании в двойном против теоретического объеме 0,01 н. раствора едкого натра, полученный раствор титруют 0,01 н. раствором соляной или серной кислоты

с бромтимоловым синим в качестве индикатора. Прямое титрование 0,01 н. раствором едкого натра не удается из-за медленной реакции 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты с разбавленными щелочами.

Ход определения SH-групп в белках

В пробу (конечный объем 10 мл) вносят 3 мл белкового раствора, 2 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 8) и 5 мл воды (проба А). Количество вносимого в пробы белка зависит от содержания в нем SH-групп. Так, при работе с очищенными препаратами моноаминоксидазы печени крысы, содержащими около 8 М SH-групп/ 10^5 г белка, в пробу А вносили 1—0,5 мг белка,

Из пробы А отбирают 3 мл и добавляют к ним микропипеткой 0,02 мл реактива Элмана. Пробу быстро перемешивают, при этом развивается желтая окраска. Через 2 мин оптическую плотность проб измеряют на спектрофотометре при 412 нм. Таким образом можно определить быстрореагирующие SH-группы белка (Ю. М. Торчинский, 1971). Если в исследуемом белке имеются медленно реагирующие SH-группы, то окраска может развиваться в течение более продолжительного времени. Измерения оптической плотности производят через каждые 5 мин до тех пор, пока ее значение не будет постоянным. Измерение величин оптической плотности опытной пробы производят против контрольной пробы, в которую вместо реактива Элмана добавлено 0,02 мл воды.

Содержание тиоловых групп находят по формуле:

$$C_0 = \frac{A}{\varepsilon} \cdot D,$$

где C_0 — искомая концентрация SH-групп (моль/л); A — прирост оптической плотности опытной пробы за время, достаточное для завершения реакции; ε — коэффициент молярной экстинкции ТНФА ($\varepsilon = 11\,400$); D — фактор разведения.

Так, например, если прирост оптической плотности после инкубации пробы с реактивом Элмана составил 0,087, то

$$C_0 = \frac{0,087}{11\,400} \cdot \frac{10}{3} \cdot \frac{3,02}{3}$$
$$C_0 = 2,54 \cdot 10^{-5} \text{ М.}$$

Далее проводят расчет содержания SH-групп на моль белка или, если относительная молекулярная масса белка неизвестна, на 10^5 г белка. Если в нашем случае в 1 л исследуемого раствора содержалось 0,31 г белка, то соответственно содержание SH-групп в 10^5 г белка будет равно

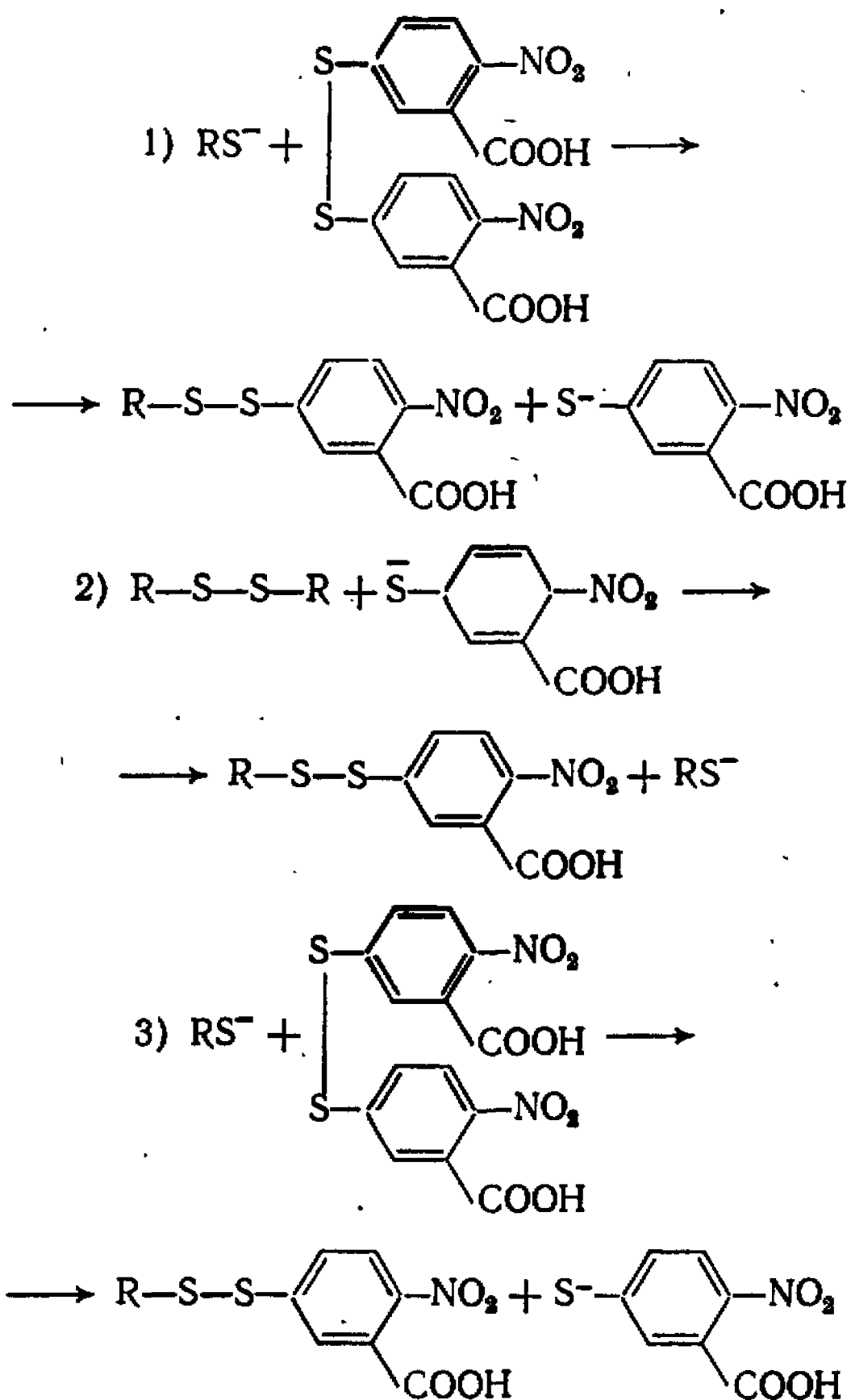
$$\frac{2,54 \cdot 10^{-5} \text{ М} \cdot 10^5 \text{ г}}{0,31 \text{ г}} = 8,2 \text{ М SH-групп} / 10^5 \text{ г белка.}$$

При работе с нерастворимыми белками (например, суспензиями митохондрий или микросом) предварительно необходимо солюбилизовать белок. Для этого суспензию белка разводят так, чтобы в 1 мл содержалось приблизительно 2 мг белка и добавляют 25% раствор неионного детергента ОП-10 до 1% концентрации в пробе. Пробу перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 1 ч. Присутствие в пробах более высоких концентраций детергента ОП-10 (2% и более) или 1% тритона X-100 снижает число титруемых реактивом Элмана SH-групп. Метод Элмана не рекомендуется применять (Butterworth e. a., 1967): 1) при титровании замаскированных SH-групп, так как при продолжительной инкубации белка с реактивом Элмана может произойти аутоокисление последнего. В этом случае рекомендуется при составлении пробы А вводить мочевины в конечной концентрации 8 М. Для этого 4,8 г перекристаллизованной мочевины растворяют в 2 мл 0,2 М трис-буфера (рН 8,0), вносят 3 мл исследуемого белкового раствора и объем пробы доводят водой до 10 мл. Далее определение проводят, как описано выше; 2) при работе с окрашенными белками, особенно с гемопротеидами; 3) в тех случаях, когда для стабилизации или активации ферментов используют тиоловые соединения (например, 2-меркаптоэтанол), титрование SH-групп возможно только после удаления тиоловых соединений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИСУЛЬФИДНЫХ ГРУПП В БЕЛКАХ

Принцип метода

Если в белках, кроме SH-групп, присутствуют и —S—S-группы, то ДТНБК может взаимодействовать и с последними. В этом случае реакция протекает по следующей схеме (Robyt e. a., 1971):



В присутствии дитиотреитола или при pH 10,5 образовавшиеся дисульфиды (правая часть уравнений 1—3) диссоциируют с образованием ТНФА. Сопоставляя содержание свободных ТНФА до и после добавления дитиотреитола (или доведения pH до 10,5), определяют количество дисульфидных групп в белке.

Реактивы

Трис-фосфатный буфер (pH 8,1), 1 М как по трис, так и по фосфату.

0,01 М К-На-фосфатный буфер (pH 8,1).

0,1 н. раствор HCl.

0,1 н. раствор NaOH.

2 mM раствор реактива Элмана (ДТНБК, относительная молекулярная масса 396,4; 7,93 мг на 10 мл) в 0,01 M фосфатном буфере (pH 8,1).

0,2 mM раствор 2-меркаптоэтанола.

Ход определения

Если исследуемый белок содержит тиоловые и дисульфидные группы, то к 2 мл раствора белка с концентрацией SH-групп примерно $0,5-10 \cdot 10^{-5}$ добавляют 0,1 мл 1 M трис-фосфатного буфера (pH 8,1) и 0,5 мл реактива Элмана. После развития окраски определяют концентрацию ТНФА, образовавшегося согласно реакции, приведенной в разделе определения SH-групп. Затем pH пробы тщательно доводят до 10,5 0,1 н. раствором NaOH и через 1—2 мин, в течение которых происходит отщепление ТНФА от дисульфидов (см. реакции 1—3), добавляют 0,1 н. раствора HCl до pH 8,1. Контролировать изменения pH пробы необходимо при помощи pH-метра, перемешивая содержимое пробы магнитной мешалкой. Доведение pH следует производить быстро, поэтому рекомендуется предварительно оттитровать необходимые количества NaOH и HCl. Так как при pH 10,5 происходит спонтанное расщепление ДТНБК, необходимо иметь контрольную пробу, содержащую только реактив Элмана. После расчета общего содержания SH-групп белка (свободные SH-группы + SH-группы, образовавшиеся из —S—S-связей), число —S—S-связей можно вычислить по следующей формуле:

$$\begin{aligned} \text{Концентрация —S—S-групп} = \\ \frac{(\text{Концентрация ТНФА при pH 10,5}) - 2(\text{Концентрация ТНФА до pH 10,5})}{2} \end{aligned}$$

Эта формула выводится следующим образом. Если белок содержит одну SH-группу и одну —S—S-связь, то сначала образуется 1 моль ТНФА на моль белка. После доведения величины pH до 10,5 освобождается еще 3 моля ТНФА, из которых 1 моль принадлежит свободной SH-группе (см. реакцию 1), поэтому перед вычитаемым в формуле стоит коэффициент 2.

При определении числа —S—S-связей в белках, не содержащих SH-групп, в опытную пробу добавляют

0,1 мл 0,2 мМ раствора 2-меркаптоэтанола и проводят реакцию, как описано выше. Контрольная проба содержит только реактив Элмана, 2-меркаптоэтанол, буфер и воду. Содержание —S—S-групп в растворе белка определяют по формуле:

$$\text{Концентрация—S—S-групп} = \frac{(\text{Концентрация ТНФА}) \text{ при pH } 10,5 - (\text{Контроль})}{2}.$$

УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ ЧЕРЕЗ АЦЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗНЫЕ* МЕМБРАНЫ

Л. В. ВОРОБЬЕВ, Р. И. ГВОЗДЕВ

В процессе выделения ферментов, других белков и нуклеиновых кислот биополимеры нередко получают в виде сильно разбавленных растворов, которые для дальнейшей работы необходимо концентрировать. Среди известных методов концентрирования биополимеров — высаливанием, осаждением органическими растворителями, испарением в мешочках для диализа, диализом против гипертонических растворов полимеров и др. — одним из наиболее удобных является метод ультрафильтрации. Этот метод позволяет проводить концентрирование при очень мягких условиях: низкой температуре, широких значениях pH, любой ионной силе раствора. Существенно, что концентрирование биополимеров происходит без концентрирования растворителя. Таким образом, денатурирующие воздействия самой процедуры сведены к минимуму.

Широкое применение этого метода задерживается малой доступностью мембран с нужным размером пор. В последние годы разработан ряд методов приготовления пленок из ацетата целлюлозы как сухим, так и влажным способом формирования, а также пленок на основе полианионов или поликатионов (фирменное название — Diaflex). В основу данной работы был положен способ влажного формирования пленки (Van Oss, Bronson, 1970).

* Ацетилцеллюлоза и ацетат целлюлозы — синонимы.

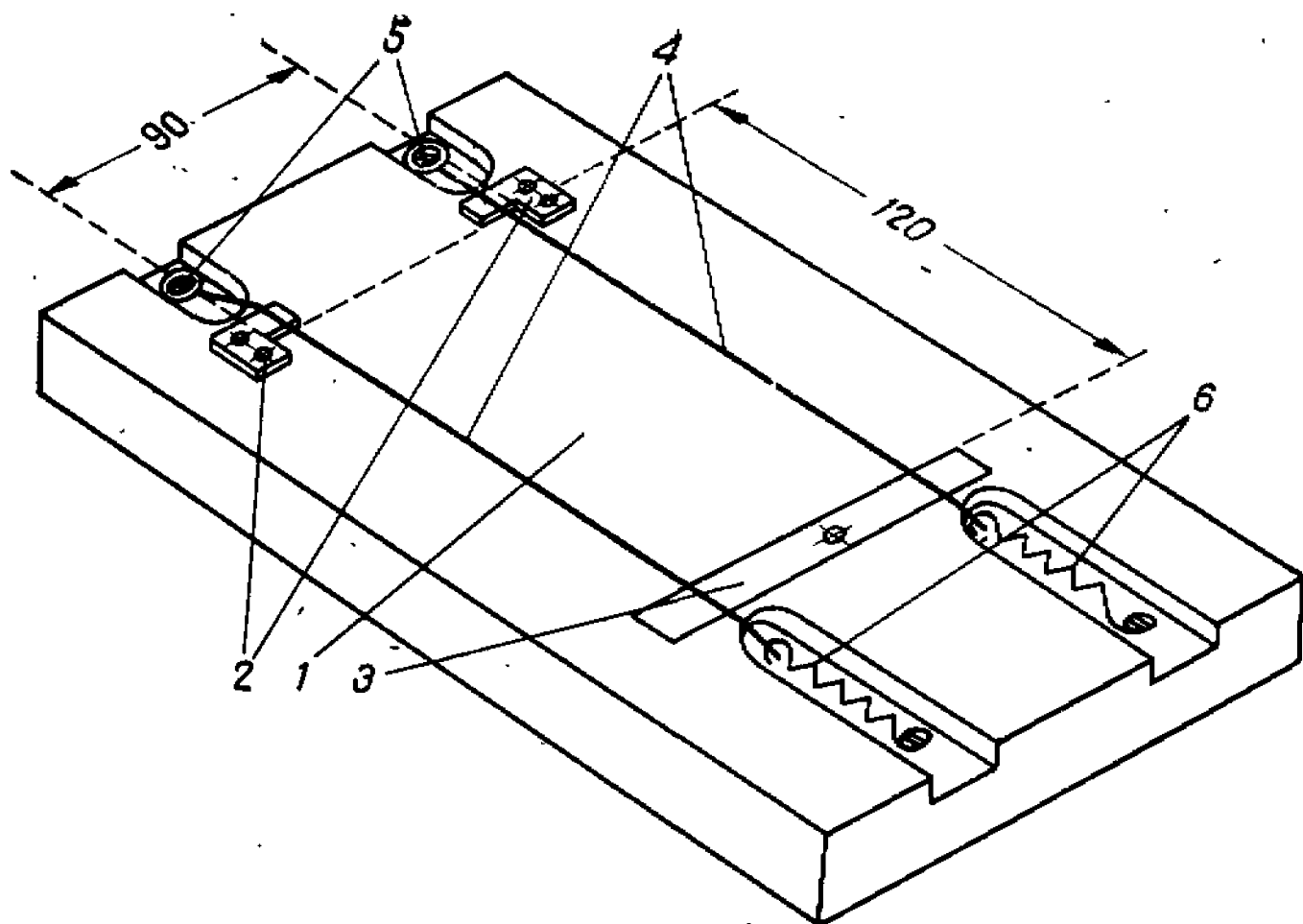


Рис. 23. Приспособление для приготовления ацетилцеллюлозных мембран.

1 — фотопластинка, 2 — уголки, 3 — планка, 4 — бортики из проволоки, 5 — закрепляющие винты, 6 — растягивающие пружинки.

В работе использовали отечественный диацетат целлюлозы, применяемый в текстильной промышленности (ГОСТ 12808-67). В соответствии с этим применен рецепт приготовления исходной смеси: к 8 г диацетата целлюлозы прибавляют 52 мл ацетона и 40 мл формамида. В колбе с притертой пробкой смесь оставляют на 1 сут при комнатной температуре до полного растворения целлюлозы.

Для формирования пленки используют отмытые от эмульсии фотопластинки (9×12 см), которые помещают в специальное приспособление, показанное на рис. 23. Стекло фиксируют с помощью двух уголков и планки. По краям стекла натягивают бортики из проволоки, которую закрепляют двумя винтами, расположенными в пазах основания. Пружинки, присоединенные к нижней части проволочных бортиков, натягивают проволоку и позволяют легко сбрасывать бортики при смене стекла. Варьируя диаметр проволоки, можно получать пленки различной толщины. В работе использовали проволоку диаметрами 0,15, 0,20 и 0,25 мм и формировали пленки заданной толщины.

Раствор целлюлозы (2,5—3,5 мл) пипеткой со шлифованным кончиком быстро наносят в виде полосы по

верхнему краю стекла, затем быстрым и равномерным движением с помощью пластинки распределяют раствор по всей поверхности стекла. Пластика для распределения раствора ацетилцеллюлозы может быть изготовлена из любого подходящего материала (стекло, оргстекло, нержавеющая сталь). Существенно, чтобы ее край, скользящий по проволочным бортикам, был безукоризненно ровным и хорошо отшлифованным, что обеспечивает одинаковую толщину пленки по всей поверхности стекла. Стекло с нанесенным слоем ацетилцеллюлозы тотчас же погружают в воду, охлажденную до 0 °С. Через 30—40 мин мембрана отставала от стекла и могла быть использована для работы. Полученные мембраны анизотропны, поэтому, для того чтобы различить верхнюю и нижнюю стороны мембраны, в ее нижнем левом углу делают перфорацию. Готовые пленки хранят в 10—15% растворе метанола при 4 °С. Перед работой для полного удаления ацетона и формамида пленки нагревают до 60—70 °С в течение не менее 30 мин в достаточном количестве дистиллированной воды. Неполное удаление растворителей может в дальнейшем привести к денатурации концентрируемых белков.

Для ультрафильтрации белков применяют аппарат, размеры которого могут варьировать в зависимости от объема концентрируемого раствора. Конструкция аппарата позволяет плотно закреплять мембрану и создавать необходимый для ультрафильтрации перепад давлений (рис. 24). Диск мембраны, вырезанный по размерам установки, помещают на подложку из пористой пластмассы или пористого металла (размер пор 1—10 мкм). Так как полученные пленки анизотропны, важно, чтобы верхняя сторона пленки была обращена вверх к концентрируемому раствору белка. Мембрану накрывают стаканом из оргстекла, равномерно и плотно зажимают тремя прижимными гайками. Необходимая герметичность обеспечивается резиновыми прокладками. Чтобы предотвратить забивание пор мембраны биополимером, значительно уменьшающее скорость ультрафильтрации, раствор перемешивают с помощью подвесной магнитной мешалки.

Через резиновую прокладку в верхней части аппарата в него вводят раствор концентрируемого белка, через нее же вводят иглу, соединяющую установку с источником избыточного давления.

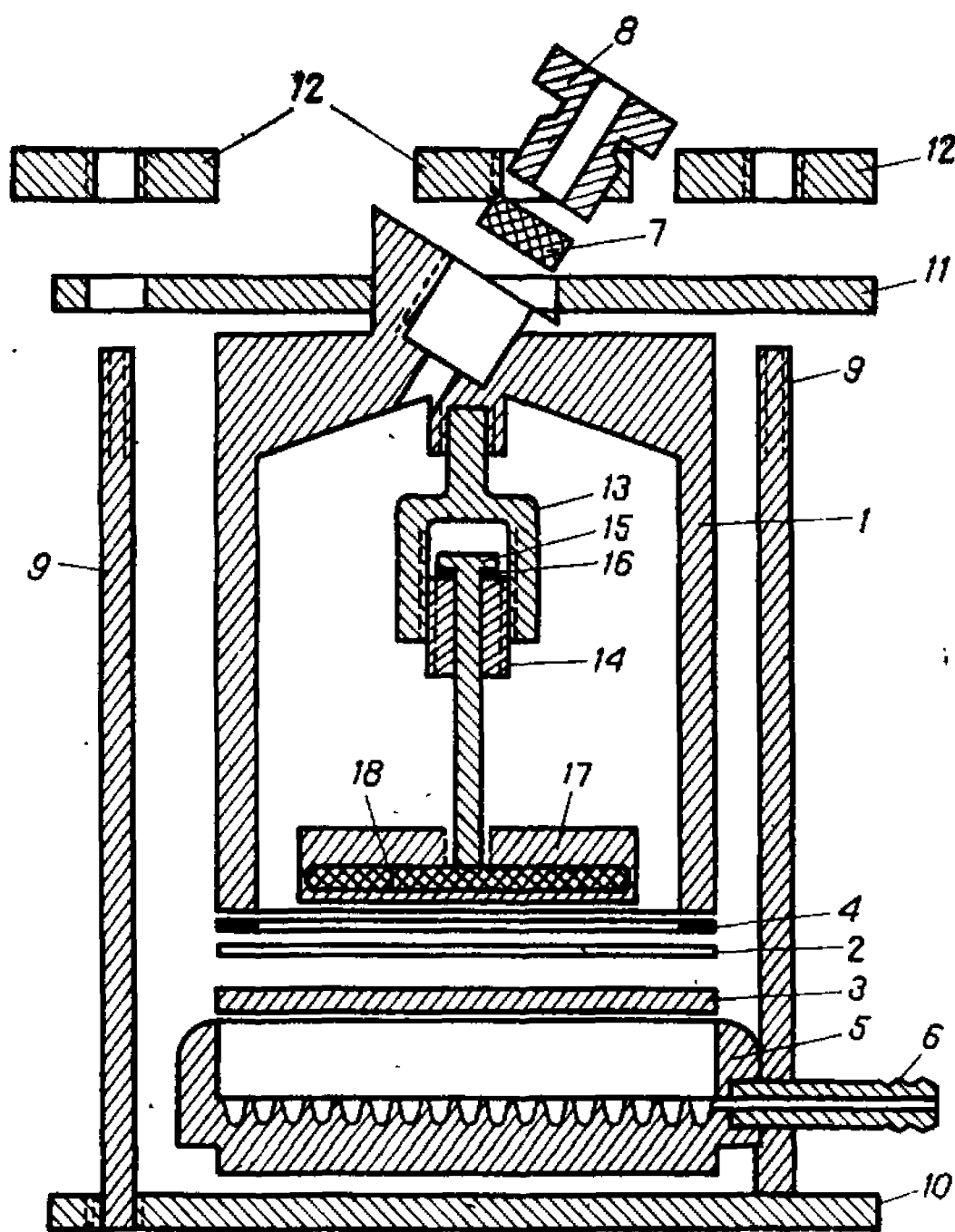


Рис. 24. Установка для ультрафильтрации биополимеров.

1 — стакан, 2 — мембраны для ультрафильтрации, 3 — пористая пластина, 4 — прокладка из резины толщиной 0,5—1,0 мм, 5 — прижимная панель с приемником, 6 — отводящая втулка, 7 — прокладка из вакуумной резины толщиной 6 мм, 8 — прижимная гайка, 9 — прижимные болты, 10 — держатель из нержавеющей стали с прижимными болтами, 11 — прижимная крышка из нержавеющей стали, 12 — прижимная гайка, 13 — держатель, 14 — втулка держателя, 15 — держатель мешалки, 16 — прокладка, 17 — магнитная мешалка с магнитным стержнем 18.

1, 5, 6, 8, 13, 15, 17 — из оргстекла; 9, 10, 11, 12 — из нержавеющей стали; 14, 16 — из тефлона. Поверхности стакана 1 и прижимной панели с первичным приемником 5 должны быть тщательно отполированы до прозрачного состояния.

В случае работы с ферментами, чувствительными к действию кислорода, ультрафильтрация может быть осуществлена в анаэробных условиях. Для этого внутренний объем заполняют буфером, через который в течение 10—25 мин пропускают инертный газ. Дополнительную иглу для выхода газа вводят через ту же верхнюю прокладку. После удаления кислорода буферный раствор продавливают через мембрану и тем самым удаляют кислород из пространства под мембраной. Аппарат

заполняют через шприц, избыточное давление создают аргоном, азотом или гелием.

Сравнение мембран разной толщины (0,15, 0,20, и 0,25 мм) показало, что наибольшей скоростью фильтрации обладают самые тонкие пленки. Удельная скорость фильтрации через пленки толщиной 0,15 мм, определенная по дистиллированной воде, составила 0,1—0,15 мл $\text{см}^{-2}\text{мин}^{-1}$ при 1 атм избыточного давления.

При повышении давления до 2 атм скорость фильтрации увеличивается на $\frac{1}{2}$ — $\frac{2}{3}$ первоначальной величины, при 3 атм прибавка составляет $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{8}$ часть, при 4 атм — $\frac{1}{8}$ — $\frac{1}{10}$ часть. Таким образом, прирост скорости фильтрации все время отстает от нарастания давления и увеличение последнего свыше 4 атм практически нецелесообразно, так как уже не вызывает заметного увеличения скорости тока жидкости. Сравнение мембран разных серий обнаруживает значительный разброс данных (на 50—70%), вероятно, неизбежный при ручном изготовлении мембран.

В качестве стандартного белкового раствора для проверки мембран используют раствор окрашенного белка — гемоглобина, что позволяет легко следить за процессом ультрафильтрации. Сравнение исходной концентрации гемоглобина с его концентрацией в фильтрате показало, что через пленки проходит не более 1,5—2% гемоглобина, т. е. мембраны практически полностью задерживают гемоглобин. Скорость ультрафильтрации раствора гемоглобина при постоянном давлении постепенно снижается во времени до некоторого постоянного уровня, составляющего $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{8}$ часть от скорости фильтрации воды, и в дальнейшем остается практически постоянной до концентрирования белкового раствора до пастообразного состояния.

Кратковременный выигрыш в скорости ультрафильтрации раствора гемоглобина при повышении давления, очень скоро сменяется постепенным замедлением скорости, связанным с забиванием пор мембраны, так что повышение давления свыше 2—2,5 атм практически не дает выигрыша в скорости процесса. Скорость ультрафильтрации растворов гемоглобина при давлении 2 атм равна 0,07 мл $\text{см}^{-2}\text{мин}^{-1}$.

Как видно из результатов эксперимента, скорость ультрафильтрации возрастает с уменьшением толщины мембраны. Однако параллельно ухудшаются

ее механические свойства и пленка толщиной менее 0,1 мм неудобна в работе. Поэтому кажется перспективным использование механически прочной подложки, на которую можно нанести тончайший слой фильтрующего материала.

Варьируя концентрацию ацетата целлюлозы можно изготавливать пленки, имеющие широкий диапазон размера пор. Концентрированные растворы ацетилцеллюлозы дают пленки с малыми порами, более разбавленные растворы образуют пленки с крупными порами. Таким образом можно изготавливать пленки с определенным размером пор, которые могут обеспечить фракционирование биополимеров по относительной молекулярной массе со значительными скоростями ультрафильтрации.

ОЧИСТКА КОММЕРЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТАМИНСУЛЬФАТА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, КИСЛЫХ И ОСНОВНЫХ БЕЛКОВ

**Р. И. ГВОЗДЕВ, А. В. ТАТЬЯНЕНКО,
З. П. БЕЛОВА, А. П. САДКОВ**

Протамины — белки с относительной молекулярной массой 4000—10 000, в связи с чем они легко проходят через полупроницаемые мембраны. В состав протаминов входит всего лишь несколько аминокислот, причем основным компонентом (80—90%, в зависимости от происхождения белка) является аргинин, который и придает протаминам основной характер. Кроме того, эти белки имеют небольшое количество моноаминокислот и пролина и не содержат тирозина, триптофана, фенилаланина, цистеина и метионина (Murray, 1965).

Протамины образуют комплексы с нуклеиновыми кислотами и в виде таких комплексов существуют в живой клетке. Эти комплексы легко диссоциируют в разбавленных растворах кислот (H_2SO_4 , HCl и др.) с образованием протаминсульфатов, протамингидрохлоридов и др. Этот способ используют для экстракции протаминов из спермы рыб. Протаминсульфаты или протамингидрохлориды подвергают дальнейшей очистке путем многократного последовательного осаждения пикратом

натрия или солями тяжелых металлов и органическими растворителями (спиртом или ацетоном). Полученные таким образом протамины после лиофилизации представляют собой белые порошки (Felix, 1960). Обычно такие порошки и являются коммерческими препаратами протаминов. Как правило, в состав этих препаратов входит несколько белковых компонентов, отличающихся по относительной молекулярной массе, аминокислотному составу и другим физико-химическим характеристикам.

ОЧИСТКА ПРОТАМИНОВ

Приготавливали 10% раствор коммерческого препарата протаминсульфата (фирма «Спофа», Чехословакия или фирма «Weddel pharmaceutical», Англия), в 0,01 М трис-HCl буфере (pH 6,0) при нагревании до 30—40 °C. Раствор с помощью 5 М раствора КОН нейтрализовали до pH 6,0, нерастворимый материал удаляли центрифугированием при 5000 g в течение 10—15 мин при 20—30 °C. Надосадочную фракцию подвергали гельфильтрации на колонке (3×50 см или 5×50 см) с сефадексом G-25 (тонкий) или G-50 (средний). Протамины элюировали 0,5 мМ трис-HCl буфером (pH 6,0). Профиль элюции протаминов значительно варьирует в зависимости от партии протаминсульфата. При фракционировании препарата фирмы «Спофа» обычно выделяются три белковые фракции (I, II и III) и фракция IV небелкового происхождения (рис. 25). Для дополнительной очистки этих фракций каждую из них вновь подвергали гельфильтрации. Для этого белковые фракции, отвечающие определенным пикам на кривой элюции (280 нм), высушивали под вакуумом, растворяли в воде и проводили повторную гельфильтрацию. $D_{280/260}$ для фракции I равно 1,01, для фракции II — 0,96 и для фракции III — 0,94.

При электрофорезе в 7% полиакриламидном геле в каждой из полученных фракций наблюдали присутствие одной полосы с одним и тем же значением R_f , что скорее может быть обусловлено не одинаковой для всех трех фракций электрофоретической подвижностью, но слишком низкой для фракционирования протаминов концентрацией геля.

Протаминсульфат фирмы «Weddel pharmaceutical» при фракционировании на сефадексах в низких концент-

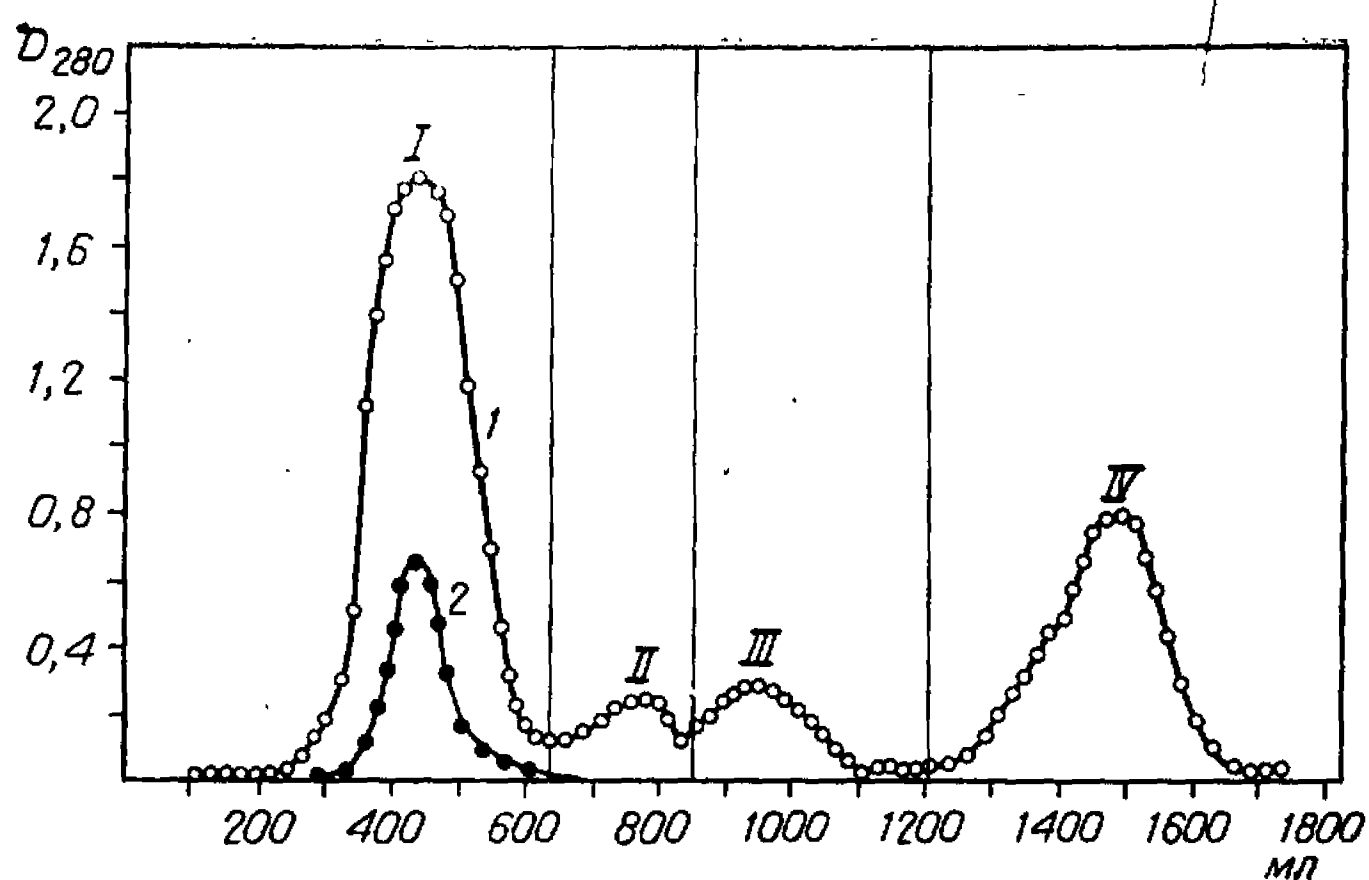


Рис. 25. Гельфильтрация препаратов протаминсульфата через сефадекс G-25.

1 — препарат фирмы «Спофа»; 2 — препарат фирмы «Weddel pharmaceutical». На ординате — оптическая плотность при 280 нм; на абсциссе — объем элюата в миллилитрах.

рациях (до 1%) дает один пик (см. рис. 25). Однако при фракционировании 10% растворов наблюдали 2—3 компонента. Форма и положение этих пиков на кривой элюции не воспроизводились от опыта к опыту, что, возможно, указывает на частичное взаимодействие данного препарата протамин с гелем сефадекса при высоких концентрациях протамин. $D_{280/280}$ для очищенного препарата равно 0,98.

Очищенные фракции протамин использовали для сравнительного изучения степени осаждения нуклеиновых кислот и кислых белков из бесклеточных препаратов *Azotobacter vinelandii*. Бесклеточные препараты получали разрушением бактериальных клеток в полуавтоматическом дезинтеграторе конструкции КБ отделения Института химической физики АН СССР. Бесклеточные препараты центрифугировали при 65 000 g в течение 1 ч. Для дальнейшей работы использовали надосадочную фракцию (фракция Н₆₅₋₁), содержащую 30—40 мг белка на мл, и 5% водные растворы протаминов. Неочищенный препарат фирмы «Спофа» частично осаждал нуклеиновые кислоты и не осаждал кислые белки. Все три

очищенные фракции осаждали нуклеиновые кислоты в нисходящей по интенсивности осаждения последовательности $I > II > III$. Фракция III не осаждала кислые белки. Способность осаждать кислые белки у фракции I оказалась в 2—5 раз выше, чем у фракции II. Различие в степени осаждения нуклеиновых кислот и кислых белков тремя полученными фракциями протамина, по-видимому, обусловлено различием в содержании аргинина.

Несмотря на наличие одного пика на элюционной кривой при фракционировании на сефадексе G-25 протаминсульфата фирмы «Weddel pharmaceutical», степень осаждения нуклеиновых кислот и кислых белков у неочищенного препарата была в $1\frac{1}{2}$ —2 раза ниже, чем у этого же препарата после гельфильтрации.

Протаминсульфат, очищенный гельфильтрацией, значительно лучше осаждал нуклеиновые кислоты и белки, чем протаминсульфат, очищенный хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе по ранее описанному методу (Phillips, West, 1964).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТАМИНА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, КИСЛЫХ И ОСНОВНЫХ БЕЛКОВ

На рис. 26 приведены данные по фракционированию протамином нуклеиновых кислот, кислых и основных белков из бесклеточного препарата *Azotobacter vinelandii*. При выделении нуклеиновых кислот титрование протаминсульфатом следует прекращать, когда $D_{280/260}$ будет больше 1 (фракция НК). Нерастворимый комплекс нуклеиновых кислот с протамином легко отделяется центрифугированием при 3000—5000 g в течение 10—15 мин. При дальнейшем титровании образуется нерастворимый комплекс протаминсульфата с кислыми белками, который также легко отделяется центрифугированием при 3000—5000 g в течение 10—15 мин (фракция КБ).

Надосадочная фракция содержит основные белки, не осаждающиеся при дальнейшем добавлении протаминсульфата (фракция ОБ).

Для получения нуклеиновых кислот в растворимом состоянии осадок фракции НК суспендируют в 0,01—0,02 M буферном растворе (pH 6—8) и осаждают центрифугированием. Эта операция проводится дважды.

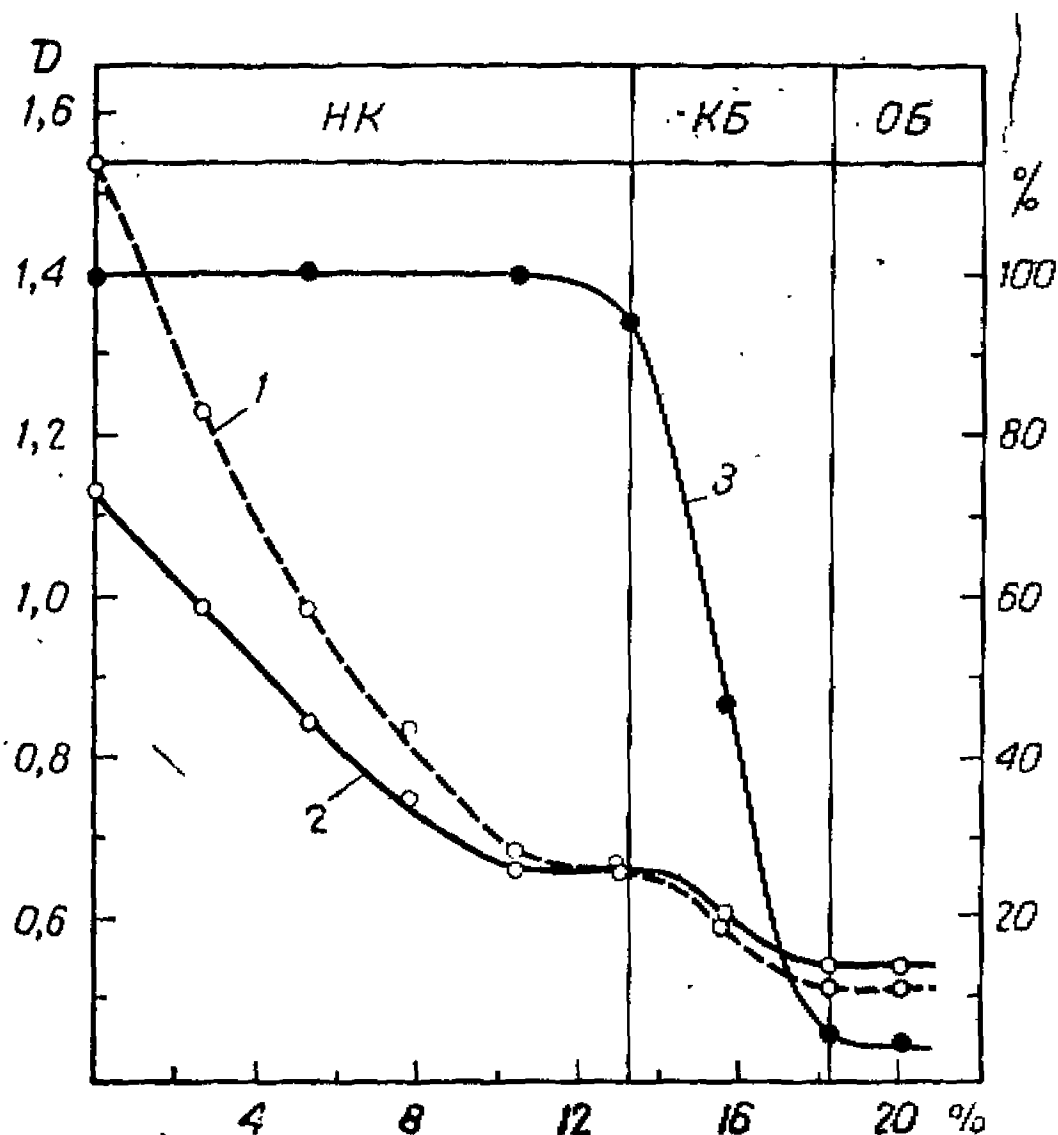


Рис. 26. Титрование грубого бесклеточного препарата *Azotobacter vinelandii* протаминсульфатом (ПС).

1 — поглощение при 260 нм, 2 — поглощение при 280 нм, 3 — активность нитрогеназы, определенная по выделению H_2 при давлении, равном 0,05 мм рт. ст., по методу В. А. Ивлева и др. (1971).

На ординате — оптическая плотность (кривые 1 и 2) и активность нитрогеназы в процентах (кривая 3); на абсциссе — концентрация добавленного ПС в проценте по отношению к белку бесклеточного препарата.

Промытый таким образом осадок суспендируют в 0,05—0,1 М растворе соляной или серной кислоты.

Для получения кислых белков в растворимом состоянии фракцию КБ суспендируют с фосфоцеллюлозой. Коммерческую фосфоцеллюлозу 15—20 мин перемешивают магнитной мешалкой в 0,5 М растворе NaOH, отмывают водой, 15—20 мин перемешивают в 0,5 М растворе HCl, отмывают водой, затем 0,01 М буферным раствором (pH 6,5—8,0) до нужного значения pH. Протамин, образующий более прочный комплекс с фосфоцеллюлозой, удаляют вместе с фосфоцеллюлозой либо центрифугированием при 10 000—20 000 g в течение 20—25 мин, либо фильтрованием. В надосадочной фракции или фильтрате остаются кислые белки. Количество фосфоцеллюлозы, необходимое для полного связывания протамин, подбирается титрованием.

Для получения основных белков нуклеиновые кислоты и кислые белки полностью удаляют избытком протаминсульфата, как указано на рис. 26.

При описанных условиях фракционирования фракция НК содержит небольшое количество белка, а кислые белки (на примере нитрогеназы, см. рис. 26) во фракции КБ очищаются в 4—6 раз по сравнению с исходным материалом. Результаты очистки очень хорошо воспроизводятся.

Следует учитывать, что образование нерастворимых комплексов протаминсульфата с нуклеиновыми кислотами и кислыми белками обусловлено образованием связи между фосфатными группами нуклеиновых кислот и карбоксильными группами белков с аминогруппой аргинина протаминсульфата. Эта связь имеет ионную природу, поэтому при повышении ионной силы раствора степень образования ионных связей между NH_2 -группами аргинина и фосфатными и карбоксильными группами резко снижается. При высоких концентрациях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (выше 0,5 М) образование нерастворимого комплекса кислых белков с протамином может вообще не наблюдаться, даже при добавлении больших избытков протаминсульфата.

Поэтому для воспроизводимого количественного осаждения нуклеиновых кислот и кислых белков протаминсульфатом необходимо соблюдать два условия: 1) иметь фракцию протаминсульфата, обладающую высокой степенью комплексообразования с кислотами; 2) исходные белковые растворы протаминсульфата и бесклеточного препарата должны иметь сравнительно низкую ионную силу.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ГЕМОГЛОБИНОВ НА АЦЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЕ

О. В. ТРОИЦКАЯ

При гемоглобиновых болезнях (гемолитические анемии) картина крови и клинические проявления сходны для многих заболеваний различного происхождения. Поэтому при дифференциальной диагностике гемоглобинозов большое значение имеет электрофоретическое исследование гемоглобина.

Электрофорез гемоглобинов на пленках из ацетата целлюлозы (Graham, Grunbaum, 1963; Sulis e. a., 1968)

является наиболее быстрым и удобным методом выявления гемоглобиновых заболеваний. Метод может быть использован как для обнаружения аномальных гемоглобинов, так и для количественного определения Hb A₂ при выявлении гетерозиготного носительства β-талассемии.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Ацетилцеллюлозная пленка для электрофореза (выпускается НИИ синтетических смол, г. Владимир).

Прибор для электрофореза на полосах из ацетата целлюлозы типа ЭФПА 250-0,05 (разработан и выпускается малой серией СКБ БФА, г. Москва).

Буферный раствор для электрофореза (рН 8,9) состава:

трис(гидрооксиметил)аминометан	12 г
трилон В	1,56 г
борная кислота	0,92 г
вода	До 1 л

Раствор амидочерного для окрашивания белка, состава:

амидошварц 10 Б	10 г
трихлоруксусная кислота	30 г
сульфосалициловая кислота	30 г
вода	До 1 л

Раствор для отмывания полос после окрашивания, состава:

метиловый (или этиловый) спирт
ледяная уксусная кислота
вода

Раствор бензидина для окрашивания соединений, содержащих гем, состава:

бензидин	0,2 г	500 мл
уксусная кислота	0,5 мл	100 мл
вода	100 мл	400 мл

Перед употреблением добавляют 0,2 мл 30% перекиси водорода.

Элюирующий раствор — 80% уксусная кислота.

Растворы для просветления пленок:

- 1) Вазелиновое масло
- 2) Уксусная кислота 10 мл и
Метанол 90 мл.

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕМОЛИЗАТА

Цельную кровь, взятую в пробирки с гепарином, центрифугируют в течение 15—20 мин при 1000 g, центрифугат отбрасывают. Эритроциты 3 раза промывают 3-кратным объемом физиологического раствора, тщательно перемешивая, и центрифугируют 15—20 мин при 1000 g. К эритроцитарной массе добавляют равный объем воды и 4—5 капель хлороформа, затем смесь энергично перемешивают в течение 5 мин и центрифугируют 1 ч при 1000 g. Гемолизат (верхняя фаза) отсасывают капилляром и хранят в закрытых флаконах в холодильнике.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Полосы ацетилцеллюлозной пленки матовой стороной вверх помещают на поверхность буферного раствора так, чтобы они плавали, а через 1—2 мин пленки погружают в раствор полностью и оставляют смачиваться в течение 10 мин. Потом полосы кладут между листами фильтровальной бумаги и осторожно удаляют избыток буфера. Смоченные буферным раствором полосы помещают в камеру для электрофореза, хорошо натягивают с помощью специальных валиков, имеющих в аппарате, и на 10 мин включают рабочее напряжение — 250 В. Затем ток выключают и наносят образцы.

Для нанесения образцов применяют специальный аппликатор из оргстекла в виде пластинки с тонкими зубчиками (щетка). На одну полосу из ацетата целлюлозы можно сделать одно нанесение во всю ширину полосы или можно сделать два или даже три отдельных нанесения рядом, что удобно для сравнения различных образцов. Объем наносимой пробы определяется аппликатором. Обычно на одну полосу наносят примерно 1—2 мкл гемолизата при концентрации гемоглобина в нем 10—15%. Если гемолизат имеет почему-либо меньшую концентрацию, то можно сделать два нанесения строго в одно и то же место.

Электрофорез проводят в течение 2 ч при напряжении 250 В (сила тока на 5 полос от 2 до 6 мА). Всего на приборе ЭФПА 250-0,05 можно поставить 10 полос — две камеры по 5 полос. После окончания электрофореза полосы из ацетата целлюлозы для окрашивания

белковых зон помещают в раствор амидочерного на 10 мин и затем в отмывающий раствор. Отмывающий раствор меняют несколько раз до тех пор, пока он не станет бесцветным. Затем пленки погружают в воду на 15—20 мин и высушивают между листами фильтровальной бумаги под прессом.

Для проявления гемоглобиновых зон бензидином полосы после электрофореза помещают в бензидиновый реактив. Перекись водорода добавляют в реактив непосредственно перед проявлением. Окраска развивается в течение 30 мин. Гемоглобины дают голубую окраску, которая затем переходит в коричневую. Полосы переносят в воду и затем высушивают между листами фильтровальной бумаги под прессом. Белки, не содержащие гема, бензидиновый реактив не проявляет.

ПРОСВЕТЛЕНИЕ ПОЛОС

Для оценки фракций с помощью денситометра ацетилцеллюлозную пленку необходимо предварительно просветлить. Для этого существует несколько способов. 1. Сухую пленку помещают в вазелиновое масло, промокают фильтровальной бумагой и кладут между двумя предметными стеклами, удалив пузырьки воздуха. 2. Пленку помещают на 2 мин в безводный метанол и затем на 30—60 с (не больше) в 10% раствор уксусной кислоты в безводном метаноле. Затем пленку накатывают стеклянной палочкой на предметное стекло, удаляя пузырьки воздуха, и оставляют в термостате при температуре 70—80 °C до полного высыхания.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В норме фракции гемолизата (рис. 27, А) на электрофореграмме распределяются следующим образом: первые две небольшие зоны принадлежат негемовому белку (Х-протеин), причем первая от линии старта зона окрашена слабее второй; следующей после негемового белка проявляется зона HbA₂ и затем иногда видна узкая зона HbF; далее идет интенсивно окрашенная зона HbA, с ней сливается последняя размытая зона HbA₃.

Фракции негемового белка не представляют интереса для диагностики гемоглобиновых заболеваний. Для того чтобы ошибочно не принять полосы негемового белка за

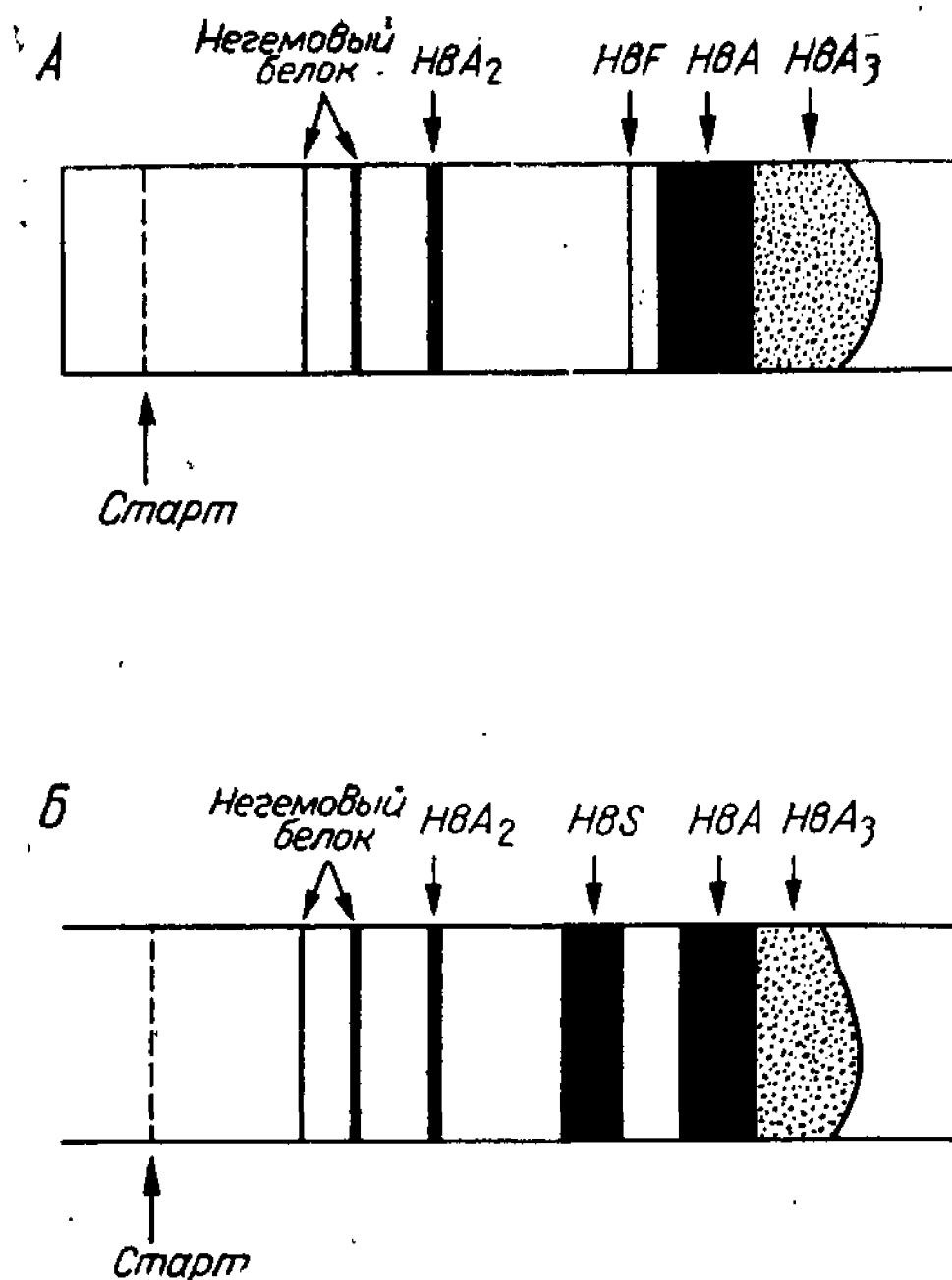


Рис. 27. Схема расположения зон гемоглобинов человека при электрофорезе на ацетилцеллюлозной пленке.

А — здоровый человек, Б — гетерозиготный носитель HbS.

зону HbA₂, рекомендуется проводить окрашивание бензидином. Негемовый белок не дает окраски с бензидином, тогда как HbA₂ окрашивается бензидином в ярко-голубой цвет, как и все остальные фракции гемоглобина. Происхождение фракции HbA₃ неясно, ее также не используют в диагностических целях и при количественных определениях присоединяют к фракции HbA. На рис. 27,Б изображено распределение фракций в случае гетерозиготного носительства HbS.

При идентификации аномальных фракций гемоглобинов удобно делать несколько параллельных нанесений на одну пленку. В качестве контроля для сравнения с исследуемым гемоглобином используют нормальный гемоглобин или известный аномальный. Электрофореграммы, полученные на различных пленках, даже в одном и том же опыте, сравнивать друг с другом труднее.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ HbA₂ И ДРУГИХ ФРАКЦИЙ ГЕМОГЛОБИНА

Определение процентного содержания HbA₂ имеет очень большое значение при диагностике талассемии. Для определения содержания HbA₂ можно просветлить пленку и провести денситометрирование. Можно, однако, обойтись и без денситометра и использовать элюционную технику, которая дает не менее достоверные результаты.

Для количественных определений вырезают из ацетилцеллюлозной полосы окрашенные амидочерным фракции HbA₂ и HbA, помещают их в отдельные пробирки и добавляют 80% уксусную кислоту — по 4 мл в пробирку с HbA₂ и в контрольную пробу — и 20 мл в пробирку с HbA. Контролем служит свободный от белка участок той же ацетилцеллюлозной полосы, по размеру соответствующей зоне HbA₂. Пленка из ацетата целлюлозы полностью растворяется в 80% уксусной кислоте. Содержимое пробирок тщательно перемешивают сначала стеклянной палочкой, потом опрокидывая пробирку, и затем фотометрируют против контроля на спектрофотометре СФ-4 при длине волны 610 нм. Расчет проводят по формуле:

$$\text{HbA}_2\% = \frac{D \text{ HbA}}{D \text{ HbA}_2 + 5D \text{ HbA}} \cdot 100,$$

где D — значение оптической плотности при 610 нм соответствующих проб.

Нормальные значения содержания HbA₂ составляют в среднем 1,5—2,5%. Если значения процентного содержания HbA₂ превышают 3—4%, то они рассматриваются как повышенные и являются основанием для предположения талассемии.

В случае гетерозиготного носительства аномальных гемоглобинов, например при наличии гемоглобина S, с помощью электрофореза на ацетате целлюлозы можно определить не только процентное содержание HbA₂, но и процентное содержание нормальной фракции (HbA) и патологической (HbS). В этом случае зоны, соответствующие фракциям HbA₂, HbS и HbA, вырезают, помещают в отдельные пробирки, в пробирку с HbA₂ и в контрольную наливают по 4 мл 80% уксусной кислоты, а

в пробирку с HbS и HbA — по 10 мл, пробы фотометрируют и расчет проводят по формулам:

$$\text{HbA}_2\% = \frac{D \text{ HbA}_2}{D \text{ HbA}_2 + 2,5 D \text{ HbS} + 2,5 D \text{ HbA}} \cdot 100.$$

$$\text{HbS}\% = \frac{2,5 D \text{ HbS}}{D \text{ HbA}_2 + 2,5 D \text{ HbS} + 2,5 D \text{ HbA}} \cdot 100.$$

$$\text{HbA}\% = \frac{2,5 D \text{ HbA}}{D \text{ HbA}_2 + 2,5 D \text{ HbS} + 2,5 D \text{ HbA}} \cdot 100.$$

Соотношение фракций гемоглобина у гетерозиготных носителей HbS, определенное с помощью электрофореза на ацетате целлюлозы, в среднем составляет: HbA₂—3%, HbS — 35—40%, HbA — 55—60%.

Необходимо отметить, что в случае медленно движущихся аномальных фракций гемоглобина (HbS и HbD) результаты определения процентного содержания HbA₂ могут быть искусственно завышены за счет следов этих медленных фракций. В случае наличия гемоглобина E, имеющего такую же электрофоретическую подвижность, как HbA₂, определение содержания HbA₂ оказывается невозможным.

ОЦЕНКА МЕТОДА

Электрофорез на ацетилцеллюлозной пленке является быстрым и удобным отборочным методом для выявления гемоглобиновых заболеваний. Прибор для проведения электрофореза на ацетате целлюлозы малогабаритный и может использоваться даже в условиях экспедиции. Электрофорез на ацетате целлюлозы является незаменимым при диагностике β-талассемии, когда содержание HbA₂ является наиболее надежным диагностическим тестом. Однако с помощью электрофореза на ацетате целлюлозы нельзя дать количественную оценку HbF, так как содержание его слишком мало (в норме в среднем 1%). Поэтому данные относительно фракционного состава гемоглобина, полученные при электрофорезе на ацетате целлюлозы, необходимо дополнить количественным определением фетального гемоглобина (Г. В. Дервиз, 1969). При наличии аномальных гемоглобинов электрофорез на ацетате целлюлозы желательно дополнять другими высокоразрешающими электрофоретическими мето-

дами (электрофорез на полиакриламидном и крахмальном геле), позволяющими выявлять более тонкие различия в электрофоретической подвижности.

ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИЙ ЛИПОПРОТЕИДОВ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

Е. Н. ЛЕВИТОВА

Липопротейды, являющиеся одним из компонентов сыворотки крови, обеспечивают транспорт жира и принимают участие в ряде важных метаболических реакций организма. Большой интерес представляет исследование этих комплексных соединений с точки зрения их роли в патогенезе атеросклероза. Необходимость разностороннего изучения липопротейдов обусловила разработку различных методов их выделения. Среди них большое распространение получили методы препаративного выделения липопротейдов сыворотки крови с помощью ультрацентрифугирования. Они основаны на различиях в плотности и размерах частиц липопротейдов отдельных классов. Фракции липопротейдов выделяют, варьируя плотность растворителей, скорость вращения ротора и время центрифугирования (Lindgren, Jensen, 1972). Описанный ниже метод основан на работах Gustafson и соавторов (1965) и Havel и соавторов (1955) и позволяет выделить из сыворотки крови человека 2 подфракций хиломикронов ($s_f > 5000$ и $400-5000$ S), 3 подфракции липопротейдов очень низкой плотности (s_f 100—400, 50—100 и 20—50 S), 2 подфракции липопротейдов низкой плотности (s_f 12—20 и 0—12 S) и фракцию липопротейдов высокой плотности ($F_{1,20}$ 0—9 S).

РАСТВОРЫ И ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЕ (KORN, 1959; GUSTAFSON e. a., 1965)

1. Буферный раствор с плотностью $1,0055 \text{ г/см}^3$ * при температуре 25°C . 1,42 г безводного двузамещенного фосфата натрия, 7,27 г хлорида натрия и 0,1 г двунатриевой соли ЭДТА растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л. С помощью 1 н. раствора

* По системе СИ плотность выражается в 10^3 кг/м^3 .

соляной кислоты устанавливают pH раствора, равным 7,0.

2. Раствор с плотностью 1,006 г/см³: 9 г NaCl растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 л.

3. Раствор с плотностью 1,35 г/см³: 153 г NaCl и 354 г KBr растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 л.

4. Раствор с плотностью 1,21 г/см³: 4 мл раствора с плотностью 1,006 г/см³ смешивают с 6 мл раствора с плотностью 1,35 г/см³.

5. Раствор с плотностью 1,063 г/см³: 10 мл раствора с плотностью 1,006 г/см³ смешивают с 2 мл раствора с плотностью 1,35 г/см³.

6. Раствор с плотностью 1,085 г/см³: 10 мл раствора с плотностью 1,006 г/см³ смешивают с 3 мл раствора с плотностью 1,35 г/см³.

7. Раствор с плотностью 1,019 г/см³: 10 мл раствора с плотностью 1,006 г/см³ смешивают с 2 мл раствора с плотностью 1,085 г/см³.

В растворы 2 и 3 рекомендуется добавлять по 0,1 г двуназиевой соли ЭДТА (Lindgren, Jensen, 1972). Плотности растворов проверяют пикнометрическим методом.

ВЫДЕЛЕНИЕ ХИЛОМИКРОНОВ

Хиломикроны характеризуются скоростями флотации $>400\ S$ и гидратированной плотностью 0,93 г/см³. Поэтому они флотируют в растворе с плотностью 1,0055 г/см³, который применяется для их выделения. Меняя время центрифугирования и ускорение центробежной силы, можно выделить 2 подфракции хиломикронсв: с $s_f > 5000\ S$ и с $s_f 400-5000\ S$.

Выделение подфракции хиломикронсв с $s_f > 5000\ S$

5 мл сыворотки крови человека наливают в центрифужную пробирку объемом несколько больше 10 мл. Наслаивают на сыворотку 5 мл буферного раствора с плотностью 1,0055 г/см³. Центрифугируют 10 мин при 9500 g при температуре 4 °C. Для проведения такого центрифугирования удобен ротор типа 30.2 препаративной ультрацентрифуги «Бэкман—Спинко» и пробирки объемом 10,5 мл. Верхний слой объемом около 5 мл, содержащий подфракцию хиломикронсв с $s_f > 5000\ S$, осторожно от-

сасывают. Для отсасывания можно использовать соединенную со шприцем пастеровскую пипетку диаметром капиллярной части 1 мм и диаметром широкой части 7 мм. При отсасывании капиллярный конец пипетки должен находиться на уровне мениска жидкости у стенки центрифужной пробирки, которую слегка вращают во время этой процедуры. Выделенную подфракцию хиломикронов смешивают с четырехкратным количеством буферного раствора с плотностью $1,0055 \text{ г/см}^3$, переносят в центрифужные пробирки и повторяют центрифугирование в аналогичных условиях. При этом происходит отмывание выделяемой подфракции от примесей сопутствующих белковых фракций. Подфракция хиломикронов концентрируется в верхней части пробирки в виде мутного слоя, толщина которого зависит от количественного содержания этой подфракции в сыворотке крови. Мутный слой осторожно отсасывают и повторяют отмывание подфракции еще 3 раза. При этом объем выделяемой подфракции постепенно уменьшается, и она концентрируется во все более узком слое. Остаток сыворотки используют для выделения других фракций.

Выделение подфракции хиломикронов с s_f 400—5000 S

На остаток сыворотки объемом около 5 мл в пробирках объемом несколько больше 10 мл осторожно наслаивают буферный раствор с плотностью $1,0055 \text{ г/см}^3$ до верха пробирки (приблизительно 5 мл). Центрифугируют 30 мин при 20 000 g и температуре 4°C . Верхний слой, объемом около 5 мл, содержащий выделяемую подфракцию хиломикронов, осторожно отсасывают, как описано выше. К выделенной подфракции приливают четырехкратное количество раствора с плотностью $1,0055 \text{ г/см}^3$. Повторяют центрифугирование в тех же условиях. Промывают выделенную подфракцию буферным раствором с плотностью $1,0055 \text{ г/см}^3$ еще 2 раза.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

Фракция липопротеидов очень низкой плотности включает частицы со скоростями флотации от 20 до 400 S (при определении в среде с плотностью $1,063 \text{ г/см}^3$)

и гидратированной плотностью $1,01\text{--}1,09\text{ г/см}^3$. Как и хиломикроны, эта фракция флотирует в растворе с плотностью $1,0055\text{ г/см}^3$, который применяется для ее выделения. Увеличивая ускорение центробежной силы и время центрифугирования, можно выделить 3 подфракции липопroteидов очень низкой плотности: с s_f $100\text{--}400$, $50\text{--}100$ и $20\text{--}50\text{ S}$.

Выделение подфракции липопroteидов с s_f $100\text{--}400\text{ S}$

Остаток сыворотки после выделения хиломикронов объемом 5 мл переносят в чистые центрифужные пробирки объемом несколько больше 10 мл. Наслаивают равное количество буферного раствора с плотностью $1,0055\text{ г/см}^3$. Центрифугируют в течение 60 мин при $80\,000\text{ g}$ и температуре 4°C . Верхний слой объемом около 5 мл, содержащий подфракцию липопroteидов очень низкой плотности с s_f $100\text{--}400\text{ S}$, осторожно отсасывают, добавляют к нему четырехкратное количество буферного раствора с плотностью $1,0055\text{ г/см}^3$ и центрифугируют в тех же условиях. Отмывание и концентрирование подфракции повторяют еще 2 раза.

Выделение подфракции липопroteидов с s_f $50\text{--}100\text{ S}$

На 5 мл сыворотки, оставшейся после выделения подфракции липопroteидов с s_f $100\text{--}400\text{ S}$, наслаивают буферный раствор с плотностью $1,0055\text{ г/см}^3$ до верха пробирки объемом около 13 мл. Центрифугируют 2 ч при $105\,000\text{ g}$ и температуре 4°C . Для этой цели удобен ротор типа 40 препаративной ультрацентрифуги «Бэкман—Спинко», имеющий пробирки объемом 13,5 мл. Верхний слой объемом около 5 мл, содержащий подфракцию липопroteидов с s_f $50\text{--}100\text{ S}$, осторожно отсасывают и 3 раза промывают и концентрируют, смешивая с буферным раствором и повторяя центрифугирование в аналогичных условиях.

Выделение подфракции липопroteидов с s_f $20\text{--}50\text{ S}$

На 5 мл нижнего слоя (сыворотки, оставшейся после выделения подфракции с s_f $50\text{--}100\text{ S}$) наслаивают буферный раствор с плотностью $1,0055\text{ г/см}^3$ до верха про-

бирок объемом около 13 мл. Центрифугируют 22 ч при 105 000 g и температуре 4 °C. С этой целью можно использовать ротор типа 40 препаративной ультрацентрифуги «Бэкман—Спинко». Верхний слой желтоватого цвета, содержащий выделяемую подфракцию, осторожно отсасывают, добавляют к нему буферный раствор с плотностью 1,0055 г/см³ и повторяют центрифугирование. Промывают и концентрируют подфракцию 2 раза.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

Липопротеиды низкой плотности характеризуются скоростью флотации 0—20 S (при определении в среде с плотностью 1,063 г/см³) и гидратированной плотностью 1,01—1,05 г/см³. Выделяют 2 подфракции липопротеидов низкой плотности: с s_f 12—20 и 0—12 S.

Выделение подфракции липопротеидов с s_f 12—20 S

Подфракция липопротеидов низкой плотности с s_f 12—20 S флотирует в растворе с плотностью 1,019 г/см³. Для выделения указанной подфракции 5 мл нижнего слоя — остатка сыворотки после выделения фракций с $s_f > 20$ S — смешивают с 1 мл раствора с плотностью 1,085 г/см³. Полученную смесь помещают в центрифужную пробирку объемом несколько больше 6 мл, заполняют ее до верха раствором с плотностью 1,019 г/см³ и хорошо перемешивают. Центрифугируют 18 ч при 114 480 g и температуре 14—16 °C. Для этой цели удобно использовать ротор типа 40.3 препаративной ультрацентрифуги «Бэкман—Спинко», имеющий пробирки объемом 6,5 мл. При этих условиях липопротеиды с s_f 12—20 S всплывают и образуют слой желтого цвета в верхней части пробирки. Этот слой осторожно отсасывают. Для более полного освобождения от примесей более тяжелых фракций липопротеидов выделенную подфракцию отмывают 2 раза раствором с плотностью 1,019 г/см³ путем повторного центрифугирования в аналогичных условиях и отсасывания выделяемой подфракции.

Выделение подфракции липопротеидов с s_f 0—12 S

Подфракция липопротеидов низкой плотности с s_f 0—12 S флотирует в среде с плотностью 1,063 г/см³. Чтобы выделить указанную подфракцию, 3 мл нижнего слоя, оставшегося после выделения подфракции с s_f 12—20 S, смешивают с 1 мл раствора с плотностью 1,21 г/см³. Полученную смесь наливают в центрифужную пробирку объемом около 6 мл. Заполняют пробирку до верха раствором с плотностью 1,063 г/см³. Раствор в центрифужной пробирке тщательно перемешивают и центрифугируют 18 ч при 114 480 g и температуре 14—16 °C. Верхний слой желто-оранжевого цвета, образованный всплывшими липопротеидами с s_f 0—12 S, осторожно отсасывают, добавляют к нему раствор с плотностью 1,063 г/см³, перемешивают и повторяют центрифугирование в аналогичных условиях. Полученную подфракцию липопротеидов отсасывают.

ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИИ ЛИПОПРОТЕИДОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ

Липопротеиды высокой плотности имеют коэффициент флотации 0—9 S (при определении в среде с плотностью 1,20 г/см³). Они характеризуются гидратированной плотностью от 1,08 до 1,16 г/см³. Выделение фракции проводят в растворе с плотностью 1,21 г/см³. К 4,5 мл нижнего слоя, оставшегося после выделения подфракций липопротеидов низкой плотности, добавляют 1,117 г КВг и 1,5 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешивают. 4,5 мл этого раствора помещают в центрифужную пробирку объемом около 6 мл и заполняют ее до верха раствором с плотностью 1,21 г/см³. Перемешивают и центрифугируют 22 ч при 114 480 g и температуре 14—16 °C. Отсасывают верхний слой объемом около 1,5 мл, содержащий липопротеиды высокой плотности, и отмывают его раствором с плотностью 1,21 г/см³ путем повторного центрифугирования и отсасывания выделяемой фракции.

ВЫДЕЛЕНИЕ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНА ИЗ СЕМЯН ФАСОЛИ

И. М. КАРМАНСКИЙ

Фитогемагглютинин (ФГА) — биологически активный белок растительного происхождения. Он вызывает агглютинацию эритроцитов человека и животных, а также бласттрансформацию и митозы периферических лимфоцитов. ФГА широко применяется при различных биологических исследованиях и в медицине.

Ниже описан разработанный нами метод выделения ФГА из семян фасоли (И. М. Карманский, 1972). В его основе лежит метод Ригаса и Джонсона (Rigas, Johnson, 1964). Процедура выделения включает экстракцию кислотой, фракционирование сульфатом аммония, диализ и фракционирование ацетоном.

РЕАКТИВЫ

Концентрированная соляная кислота.

0,1 М раствор HCl; 0,15 М раствор NaCl.

Насыщенный раствор сульфата аммония (pH 1,0). 1 л раствора содержит 508 г сульфата аммония и 85 мл концентрированной соляной кислоты.

Ацетон; 1 М раствор NaOH.

ЭКСТРАКЦИЯ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ СУЛЬФАТОМ АММОНИЯ

Семена фасоли (мы использовали сорт «Московская белая зеленостручная») измельчают на шаровой мельнице или электрической кофемолке. Полученную муку (200 г) экстрагируют 1 л 0,1 М раствора HCl. Экстракцию проводят при постоянном перемешивании в течение 24 ч при 4 °С. Добавлением концентрированной соляной кислоты поддерживают pH экстракта, равным 1,0. Измеряют объем экстракта (около 1200 мл) и прибавляют к нему при постоянном перемешивании равный объем насыщенного раствора сульфата аммония (pH 1,0). Суспензию оставляют на 24 ч при 4 °С. Грубые хлопья за это время оседают на дно, надосадочную суспензию собирают сифонированием и центрифугируют при 54 000 g в течение 60 мин при 4 °С. Осадок отбрасывают, проз-

рачную надосадочную жидкость собирают, измеряют ее объем (около 1400 мл) и смешивают с равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония (рН 1,0). Полученную суспензию выдерживают в течение 24—48 ч при -10°C и затем центрифугируют при 35 000 g в течение 30 мин при -5°C . Надосадочную жидкость отбрасывают, осадок суспендируют в двойном объеме дистиллированной воды.

Полученную суспензию диализуют против дистиллированной воды при 4°C до тех пор, пока в диализате не установится рН 3,9. Для ускорения диализа его проводят против проточной дистиллированной воды. К концу диализа объем суспензии возрастает на 60—70%. Суспензию центрифугируют при 40 000 g в течение 40 мин при 4°C .

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ АЦЕТОНОМ

В очищенном центрифугированием диализате определяют концентрацию белка по поглощению раствора при 280 нм, принимая, что у суммарного белка диализата $E_{280}^{1\%} = 10,0$. Обычно концентрация белка составляет 30—32 мг/мл. Перед тем как приступить к фракционированию ацетоном, диализат разбавляют с помощью 0,15 М раствора NaCl до концентрации белка 5 мг/мл, после чего добавлением 1 М раствора NaOH доводят рН до 5,8.

К полученному разведенному диализату по каплям при постоянном перемешивании при 4°C добавляют охлажденный до 4°C ацетон из расчета 1,4 мл ацетона на 5 мл разведенного диализата. Образовавшуюся в результате добавления ацетона суспензию разливают в центрифужные пробирки, плотно закрывают крышками (во избежание улетучивания ацетона) и спустя 2 ч центрифугируют при 20 000 g в течение 20 мин. К прозрачной надосадочной жидкости прибавляют охлажденный до 4°C ацетон из расчета 1,8 мл ацетона на 5 мл исходного разведенного диализата и через 30 мин полученную суспензию центрифугируют при 20 000 g в течение 20 мин при 4°C . Осадок растворяют в 0,15 М растворе NaCl, затем диализуют против дистиллированной воды и лиофилизируют. Выход составляет 300—400 мг ФГА из 100 г фасоли.

Полученный указанным методом препарат ФГА при аналитическом ультрацентрифугировании седиментирует

одним симметричным пиком с коэффициентом седиментации 6 S. При электрофорезе в полиакриламидном геле при pH 3,5 и pH 8,9 обнаруживается основная зона, соответствующая ФГА, и слабоокрашенная полоса неактивного компонента (примеси).

Минимальная концентрация ФГА, вызывающая агглютинацию эритроцитов кролика в 0,15 М растворе NaCl, равна 0,2—0,5 мкг на мл 1% суспензии отмытых эритроцитов. Минимальная концентрация ФГА, при которой обнаруживаются митозы в культуре лимфоцитов периферической крови человека, соответствует 10 мкг на мл культуры. Максимальное количество митозов наблюдается при концентрации ФГА 30—50 мкг/мл.

Лиофилизированные препараты ФГА сохраняют свою активность в течение длительного времени (год и больше). В растворенном состоянии ФГА сравнительно быстро инактивируется: лимфоцитстимулирующая активность исчезает через 2 нед, гемагглютинирующая — через несколько месяцев.

ФГА не растворяется в дистиллированной воде, однако хорошо растворим в солевых растворах с ионной силой 0,1.

Метод определения лимфоцитостимулирующей активности ФГА описан Н. Г. Голубевой (с. 257).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ФГА

Гемагглютинирующую активность определяют по Salk (1944). Метод основан на способности ФГА склеивать эритроциты с образованием агрегатов, доступных визуальному наблюдению.

Получение эритроцитов. В стакан с 30 мл 0,15 М раствора NaCl, содержащего гепарин в концентрации 50 ИЕ в мл, собирают 5 мл крови из краевой вены уха кролика. Эритроциты отмывают трижды с помощью 0,15 М раствора NaCl путем центрифугирования при 800 g в течение 10 мин. Из отмытых эритроцитов готовят 2% суспензию (по объему) в 0,15 М растворе NaCl.

Постановка реакции гемагглютинации. С помощью 0,15 М раствора NaCl готовят двукратные разведения исследуемой белковой фракции (по 0,2 или 0,5 мл), к которым прибавляют равный объем 2% суспензии эритроцитов. Пробы инкубируют в течение 1 ч при 37 °C, после

чего визуально оценивают титр агглютинации, т. е. наименьшую концентрацию белка, вызывающую склеивание эритроцитов.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИМФОЦИТСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНА

Н. Н. ГОЛУБЕВА

Для исследования лимфоцитстимулирующей активности фитогемагглютина (ФГА) может быть применена короткоживущая культура лимфоцитов периферической крови. Эта методика впервые была предложена для изучения лимфоцитов больных лейкозами (Osgood, Brooke, 1955), затем ее использовали для анализа хромосом (Hungerford e. a., 1959)*. Впоследствии было показано, что действием ФГА можно вызвать бласттрансформацию малых лимфоцитов (Nowell, 1960). Методика культур лимфоцитов широко внедрена в иммунологические, цитологические и генетические исследования. Приводимые ниже методические указания составлены исходя из конкретной цели исследования — определения степени лимфоцитстимулирующей активности ФГА.

ВЫБОР КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ВИДОВ И СРЕДЫ ДЛЯ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Наиболее подходящим для исследования объектом являются лимфоциты периферической крови здорового человека: клетки жизнеспособны при культивировании, не требуют специального состава среды и дают стабильный ответ на известные митогены, в том числе ФГА. Также можно использовать лимфоциты периферической крови беспородных собак. Эти клетки очень чувствительны к токсическому действию препаратов, но достаточно чувствительны и к действию стимуляторов. Не рекомендуется проводить испытание митогенов на лимфоцитах кроликов или мышей. Клетки этих животных очень не стойки в культуре, кроме того, требуется особый состав сред для их культивирования.

Из готовых синтетических сред — № 199 (Паркер), Игла и Игла МЕМ — наиболее оптимальной является

среди Игла в модификация для суспензионных культур (Eagle, 1959). Если отсутствует среда с такой прописью, то можно культивировать лимфоциты в среде Игла, но флаконы для культуры должны иметь выпуклое, как у пробирки, донышко.

МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Начиная работу с этой методикой, нужно помнить, что все растворы, посуда, пробки должны быть стерильными, а все этапы работы проводиться в стерильных условиях для того, чтобы избежать бактериального загрязнения. Добавление антибиотиков не рекомендуется.

Для получения лимфоцитов берут кровь из вены в количестве 6—8 мл в силиконизированную пробирку, стенки которой смочены содержащимся в ней гепарином, разведенным $1/1000$ и взятым из расчета 0,1 мл на 1,0 мл крови. Не следует увеличивать дозу гепарина, так как он обладает депрессивным действием на лимфоциты. В настоящее время гепарин применяется в клинической трансплантологии как иммуносупрессор.

В пробирку с гепаринизированной кровью добавляют 10% стерильную ампульную желатину из расчета 1 мл на 9 мл крови, тщательно перемешивают для равномерного распределения желатины и ставят в термостат при $37,7^{\circ}\text{C}$ под углом 45° для более быстрого осаждения эритроцитов; время осаждения должно быть 30—60 мин. После осаждения эритроцитов столбик плазмы с белыми форменными элементами, составляющий $1/2$ или $1/3$ от первоначального объема, отсасывают и центрифугируют 10 мин при 900 g, надосадочную жидкость (плазма с желатиной) удаляют и к осадку прибавляют равноценный удаленному объем плазмы или сыворотки 1-й группы. Ресуспендировав клетки, подсчитывают в камере Горяева количество мононуклеаров и сегментоядерных нейтрофильных лейкоцитов. Если в клеточной взвеси имеется 50% и более гранулоцитов по сравнению с мононуклеарами, то ее нужно очистить от гранулоцитов с помощью ватной колонки. Большая примесь лейкоцитов снижает бласттрансформацию лимфоцитов.

Для приготовления колонки используют хирургическую вату, обработанную стиральным порошком «Новость» с последующей отмывкой ее в дистиллированной

воде в течение 2 дней; вату сушат в термостате, разволокняют и набивают ею колонки. Для колонок можно использовать пастеровские пипетки с отломленным тонким концом. Расширенная часть пипетки, имеющая диаметр 6—8 мм и высоту 10—12 см, может служить для фильтрации 1,0—1,5 мл клеточной взвеси. Пипетку равномерно заполняют обработанной ватой, узкий конец опускают в центрифужную пробирку, которая служит приемником фильтрата, и в таком виде стерилизуют. Непосредственно перед очисткой клеточной взвеси через согретую в термостате колонку пропускают теплый стерильный физиологический раствор для смачивания ваты и одновременной проверки правильности заполнения колонки — раствор должен вытекать равномерно, каплями среднего размера. Колонку заполняют клеточной взвесью и ставят в термостат (37 °C) на 12—15 мин, затем через колонку пропускают 6—7 мл теплого физиологического раствора. Собранный фильтрат центрифугируют 10 мин при 900 g, надосадочную жидкость удаляют, клетки ресуспендируют в первоначальном (как при нанесении на колонку) объеме плазмы и подсчитывают их количество в камере Горяева так же, как и до разделения на колонке.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КУЛЬТУР И СРОКИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

После подсчета количества клеток клеточную взвесь разводят питательной средой Игла до конечной концентрации $5\text{--}7 \times 10^5$ мононуклеаров в миллилитре, содержание плазмы или сыворотки должно составлять 15—20%. Разведенную таким образом клеточную взвесь разливают по пенициллиновым флаконам (при среде Игла для суспензионных культур) или во флаконы с выпуклым дном (при среде Игла обычного состава для монослойных культур), плотно закрывают резиновыми (черными) пробками и культивируют в термостате при температуре 37,2—37,5 °C. Исследуемые препараты ФГА обычно добавляют сразу после разлива по флаконам культуральной взвеси, причем объем их не должен превышать 0,2 мл на каждый флакон с культурой.

В связи с индивидуальной чувствительностью клеток и различной активностью препаратов, снятие культуры для учета лучше проводить в динамике — через 48, 72 и 96 ч после ее постановки.

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Питательная среда и гепарин, применяемые для опытов, должны быть предварительно проверены на токсичность. Среда Игла может храниться при 4 °С до двух лет, глутамин необходимо добавлять перед постановкой эксперимента. Исследуемый раствор митогена (ФГА) должен иметь рН 6,5—7,8. Большие концентрации белка в исследуемых дозах митогена (низкоактивные препараты) не следует вводить в культуру, так как увеличение процентного содержания белка приводит к выпадению фибриновой пленки, в которую мигрируют лимфоциты и в культуральной среде практически не остается клеток для анализа.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПЫТА

Перед снятием культуры флакон энергично встряхивают, выливают культуральную взвесь в пробирку и центрифугируют 10 мин при 900 g на центрифуге с угловым ротором для получения на стенке пробирки видимого осадка. Надосадочную жидкость сливают с противоположной осадку стороны, клетки ресуспендируют в одной капле 1% раствора цитрата натрия, наносят из каждой пробы мазки на несколько стекол, которые быстро высушивают под феном, и 5—10 мин фиксируют в метаноле. Фиксированные препараты окрашивают смесью азура с эозином. Для получения красителя предварительно готовят отдельно растворы азура и эозина, содержащие 1 г красителя в 1 л воды. Растворы выдерживают при комнатной температуре в течение 2—4 нед, затем разбавляют в 5 раз водой и смешивают; рН готового красителя доводят до 7,4—7,6. Оптимальные соотношения азура и эозина в смеси подбирают экспериментально под контролем микроскопа.

В препаратах подсчитывают 500 лимфоидных клеток разных морфологических форм. При морфологическом анализе бласттрансформации культур следует подсчитывать число нестойких, лизированных лимфоцитов на первые 100 всех клеточных форм, встречающихся в мазке. Фигуры митоза отмечают на каждые 100 (или 500) лимфоидных клеток. Процент лизированных клеток будет четко отражать степень токсичности препарата к определенной части лимфоидной популяции, так как в нести-

мулированной или стимулированной хорошо очищенным митогеном культуре уровень лизированных лимфоцитов (практически здоровых людей или животных) не превышает 18—20%.

МОРФОЛОГИЯ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Под действием митогена—стимулятора (в данном случае ФГА) культура малых лимфоцитов претерпевает превращение в разнообразные по величине и форме клеточные элементы. Бластные формы, как правило, с акцентрично расположенным ядром и вакуолизированной цитоплазмой могут встречаться также и в виде больших лимфоцитов, с центрально расположенным ядром и широким ободком цитоплазмы с вакуолями в ней. В стимулированной культуре можно встретить клетки диаметром 20—28 мкм (диаметр малого лимфоцита 5—9 мкм). Между полярными по размерам клетками имеется целый ряд переходных форм, которые могут иметь всего 12—15 мкм в диаметре, но по морфологии будут отличаться от малых или средних лимфоцитов. Нередко в таких клетках наблюдаются фигуры митоза. При оценке стимулирующего действия митогена эти клеточные формы также должны быть отнесены в число трансформированных. Следует отметить, что при постановке культуры клеток от одного и того же индивидуума с одним и

Таблица 26

Протокол морфологического учета опыта
по лимфоцитстимулирующей активности ФГА

Условия опыта	Срок культивирования, ч	Малые и средние лимфоциты, %	Бласттрансформация			Лизис клеток, %
			большие лимфоциты, %	бласты, %	митозы, количество на 500 клеток	
Культура без ФГА	72	97	2	1	0	18
Культура с ФГА	72	45	32	23	4	15

Примечания. 1. Для расчета процента различных клеточных форм (малые, средние, большие лимфоциты и бласты) подсчитывают 500 морфологических элементов в препарате.

2. Процент лизиса клеток вычисляют на первые сто всех встречающихся клеточных элементов.

тем же стимулятором отмечаются недостоверные колебания в уровне трансформации от 5 до 12%.

В заключение приводим в качестве примера протокол морфологического учета одного из множества опытов по трансформирующему и митогенному действию препарата ФГА (табл. 26), представленного И. М. Карманским (И. М. Карманский, с. 254), на культуру лимфоцитов практически здорового человека.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ БЕЛКОВ ПО ОКСИПРОЛИНУ

Т. В. ЗАМАРАЕВА

Коллагеновые белки являются основным компонентом коллагеновых волокон, образующих межклеточное вещество соединительной ткани. Количество коллагеновых белков в тканях может варьировать в зависимости от вида ткани и животного, а также при различных патологических процессах, затрагивающих обмен коллагена.

Характерной особенностью коллагена является то, что 12—14% его аминокислотных остатков приходится на оксипролин — аминокислоту, не найденную в других белках животных тканей, за исключением эластина, который содержит 1—2% оксипролина. Поэтому оксипролин можно рассматривать как своеобразную метку, по которой коллагеновые белки могут быть обнаружены в тканях.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Существующие методы определения оксипролина основаны на окислении оксипролина до соединения, близкого по строению к пирролу, и последующей конденсации этого соединения с реактивом Эрлиха (п-диметиламинобензальдегид) с образованием продукта, окрашенного в красный цвет. В зависимости от метода определения в качестве окислителя используют различные соединения: перекись водорода по методу Неймана и Логана (Neumann, Logan, 1950) и хлорамин-Т по Стеге-

ману (Stegemann, 1958). Однако окисление перекисью водорода не всегда дает хорошо воспроизводимые результаты. Описанная ниже методика определения оксипролина Бергмана и Локслей (Bergman, Loxley, 1961) представляет собой модификацию метода Стегемана.

РЕАКТИВЫ

1. Раствор окислителя.

7% водный раствор хлорамина-Т. Сохраняет свою активность в темноте при комнатной температуре в течение нескольких недель. Хлорамин-Т может быть заменен хлорамином-Б.

Ацетат-цитратный буфер (рН 6,0). Для его приготовления растворяют в воде 57 г ацетата натрия · тригидрата, 37,5 г трехзамещенного цитрата натрия · дигидрата, 5,5 г лимонной кислоты · моногидрата и 385 мл изопропилового спирта (х. ч. или перепаранный) и доводят водой объем раствора до 1 л. Буфер можно хранить при комнатной температуре неограниченно долго.

Непосредственно перед определением раствор хлорамина-Т и ацетат-цитратный буфер смешивают в отношении 1 : 4 (раствор А).

2. Реактив Эрлиха.

Перекристаллизованный п-диметиламинобензальдегид (Г. Гильман, 1949) растворяют в 57% хлорной кислоте в отношении 2 г альдегида на 3 мл кислоты. Раствор стабилен в течение 3 нед при хранении в темной склянке при комнатной температуре.

Изопропиловый спирт (х. ч.).

Перед определением оксипролина 3 объема раствора п-диметиламина бензальдегида смешивают с 13 объемами изопропилового спирта (реактив Эрлиха).

3. Стандартный раствор оксипролина (1 мг в 100 мл) готовят в 1 мМ растворе HCl для уменьшения возможности бактериального загрязнения. Раствор оксипролина хранят при 4 °С в течение нескольких месяцев.

ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА

Белки тотального препарата исследуемой ткани или различных фракций коллагена, экстрагированных из тканей (нейтрально-солерастворимый, кислоторастворимый и нерастворимый коллаген), подвергают гидролизу

в стеклянных запаянных ампулах в 6 н. растворе HCl при 100°C в течение 20—24 ч. Если в процессе гидролиза образуется большое количество пигментированных веществ, то пробы следует прогреть с небольшим количеством активированного угля, отфильтровать и промыть фильтры 6 н. раствором HCl . Далее гидролизаты белков упаривают в фарфоровых чашках на водяной бане и дважды промывают дистиллированной водой для удаления остатков соляной кислоты. Сухой остаток растворяют в точном объеме воды. 0,2 мл этого раствора берут для определения количества оксипролина.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

К 0,2 мл каждого из исследуемых растворов добавляют при помешивании 0,4 мл изопропилового спирта и 0,2 мл раствора А. Пробы хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре в течение 4 мин. Затем прибавляют по 2,6 мл реактива Эрлиха и после тщательного перемешивания нагревают в водяной бане при 60°C 25 мин. При нагревании пробирки следует закрывать каплеуловителями, чтобы избежать уменьшения объема проб. Далее пробы охлаждают, определяют оптическую плотность растворов на спектрофотометре СФ-4А в кюветах с ходом луча 1 см при длине волны 558 нм против контроля, в котором исследуемый раствор заменен 0,2 мл дистиллированной воды.

Окраска раствора не теряет своей интенсивности в течение 30 мин. Пробы со слишком интенсивной окраской могут быть разбавлены при спектрофотометрировании изопропиловым спиртом. В этом случае необходимо сделать пересчет на разбавление раствора.

Количество оксипролина в анализируемых пробах рассчитывают по калибровочной кривой, полученной на основании разведений стандартного раствора оксипролина.

Описанный метод определения оксипролина отличается хорошей воспроизводимостью и высокой чувствительностью — позволяет определять до 1 мкг оксипролина. Присутствие в исследуемых растворах NaCl и HCl в децимолярной концентрации практически не оказывает влияния на точность определения оксипролина, в то время как 0,1 н. раствор NaOH значительно снижает интенсивность окраски.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ^{14}C -ОКСИПРОЛИНА КАК МЕТОД ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СИНТЕЗА КОЛЛАГЕНА В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Т. В. ЗАМАРАЕВА

ПРИНЦИП МЕТОДА

Для изучения различных этапов синтеза коллагена в модельных системах широко используют радиоизотопный метод. Наличие в составе коллагена необычных аминокислот — оксипролина и оксилизина, не встречающихся в других белках, позволяет легко идентифицировать коллаген среди других белков животных тканей. Обнаружение ^{14}C -оксипролина после инкубации ткани с меченым по углероду пролином является наиболее существенным показателем синтеза коллагена в данной системе.

В настоящее время для изучения вопросов, связанных с исследованием места синтеза полипептидных цепей коллагена, посттрансляционных модификаций молекулы, транспорта коллагена в межклеточное пространство и т. д., используют различные модельные системы синтеза коллагена — переживающие культуры тканей, культуры соединительнотканых клеток, бесклеточные системы синтеза (см. А. Е. Берман, с. 353).

Удобной моделью для изучения синтеза коллагена *in vitro* является хрящевая ткань куриных эмбрионов, активно синтезирующая коллагеновые и другие белки. В качестве объекта исследования может быть использована хрящевая ткань теменных костей 17-дневных куриных эмбрионов или большие берцовые кости эмбрионов 10—11-дневного возраста.

Ниже описаны методика работы с хрящевой тканью куриных эмбрионов и определение ^{14}C -оксипролина по методу Жюва и Прокопа (Juva, Procop, 1966).

РЕАКТИВЫ

Среда Кребса А содержит в мМ: Na_2HPO_4 — 15,7; KH_2PO_4 — 1,6; NaCl — 111,2; KCl — 5,4; MgCl_2 — 1,3; NaHCO_3 — 4,0; глюкоза — 13,0 (Krebs, 1950).

6 н. раствор HCl и концентрированная HCl .

^{14}C -пролин (100 мкКи/ммоль).

Метилцеллозольв, перегнанный при 118—124 °С.

Сцинтилляционный раствор (Proskor, Ebert, 1963): 15 г 2,5-дифенилоксазола (ППО), 50 мг дифенилоксазолилбензола (ПОПОП) и 1 л сцинтилляционного толуола. Хранят на холоде в темной склянке.

Пролин и оксипролин.

1 н. раствор NaOH.

1% раствор фенолфталеина в 96% этаноле.

0,2 М раствор пирофосфата натрия (pH 8,0); до pH 8,0 доводят концентрированной HCl.

0,2 М раствор хлорамина-Т (свежеприготовленный).

3,6 М раствор тиосульфата натрия (под слоем толуола при комнатной температуре можно хранить в течение 1 мес).

1 М трис-HCl буфер (pH 8,0).

Сцинтилляционный толуол.

Силикагель марки КСК. Размельченный на шаровой мельнице в течение 4—5 ч силикагель (~100 мл по объему) помещают в мерный цилиндр, наливают этанол до 2 л и суспензию отстаивают 5 мин. Затем надосадочную жидкость переливают во второй цилиндр и взвесь отстаивают 30 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок вновь суспендируют в 2 л этанола и отстаивают в течение 30 мин. Эту процедуру повторяют с эфиром. Осадок сушат на воздухе и затем в течение 1 сут при 100 °С. Силикагель хранят в банках с плотно притертыми пробками.

Реактив Эрлиха (Proskor, Udenfriend, 1960). 27,4 мл концентрированной H₂SO₄ добавляют к 200 мл абсолютного спирта и смесь охлаждают. В другом стакане 120 г п-диметиламинобензальдегида (дважды перекристаллизован из абсолютного спирта) добавляют к 200 мл абсолютного спирта. Затем кислый этанол медленно при помешивании добавляют к раствору бензальдегида. Реактив Эрлиха хранят на холоде. Он пригоден в течение нескольких недель.

Пиррол, очищенный фракционной перегонкой. Стандартный раствор (0,1 мкмоль/мл) свежеперегнанного пиррола в толуоле хранили при —20 °С в течение нескольких месяцев.

ОПЫТЫ С ХРЯЩЕВОЙ ТКАНЬЮ

Целые большие берцовые кости 10—11-дневных куриных эмбрионов выделяли и очищали от окружающих мягких тканей под бинокулярной лупой в небольшом

объеме среды Кребса. После выделения кости помещали в конические колбочки со средой Кребса, находящиеся в ледяной бане. В том случае, когда был необходим контроль к опытной пробе, одну косточку эмбриона использовали в контрольной, другую — в опытной пробе. Каждая проба может содержать по 2 и более костей. Ткань преинкубировали при 37 °С в 3 мл среды Кребса в течение 1 ч при встряхивании проб, затем добавляли 4—8 мкКи ^{14}C -пролина и инкубацию продолжали еще 1—2 ч.

После окончания инкубации ткань гомогенизировали в небольшом объеме (~ 5 мл) дистиллированной воды и гомогенат диализовали в течение ночи против водопроводной и еще 4 ч против дистиллированной воды. Гидролиз белков проводили в стеклянных запаянных ампулах в 6 н. растворе HCl при 100 °С в течение 20—24 ч. После гидролиза пробы обрабатывали активированным углем для удаления пигментированных веществ, фильтровали через бумажные фильтры и промывали фильтры 6 н. раствором HCl . Фильтраты упаривали на водяной бане, дважды промывая дистиллированной водой. Сухой остаток растворяли в 3 мл воды. 0,1 мл этого раствора использовали для определения общей радиоактивности белков и 2,5 мл для определения ^{14}C -оксипролина. Радиоактивность в водных растворах определяли в системе, содержащей 0,1 мл исследуемого раствора, 3 мл метилцеллозоля и 5 мл сцинтилляционного раствора (Роскор, Ebert, 1963). Радиоактивность проб измеряли в сцинтилляционном счетчике.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ^{14}C -ОКСИПРОЛИНА

Принцип метода заключается в окислении ^{14}C -оксипролина хлорамином-Т и последующем разделении радиоактивного продукта окисления — пиррола и ^{14}C -пролина путем экстрагирования толуолом и дополнительным разделением на колонках с силикагелем.

Реакцию проводят в пробирках объемом 50 мл с притертыми пробками. К 2,5 мл исследуемого гидролизата добавляют носители — по 2 мг оксипролина и пролина; рН растворов доводят 1 н. раствором NaOH до 8,0. Затем в пробы вносят 6 мл 0,2 М раствора пиррофосфата натрия (рН 8,0) и 1,4 мл свежеприготовленного 0,2 М раствора хлорамина-Т. Смесь перемешивают при ком-

натной температуре в течение 20 мин. Реакцию окисления оксипролина хлорамином останавливают добавлением 6 мл 3,6 М раствора тиосульфата натрия. После доведения рН пробы 1 н. раствора NaOH до 8,0 (контроль по фенолфталеину) к пробам добавляют 4 мл 1 М трис-HCl буфера (рН 8,0), избыток сухого NaCl и 10 мл сцинтилляционного толуола. Пробы интенсивно встряхивают в течение 3 мин, и после расслоения толуоловой и водной фаз толуоловый слой, содержащий радиоактивный пролин, тщательно отсасывают пастеровской пипеткой, присоединенной к водоструйному насосу. Оставшуюся водную фазу, содержащую радиоактивный продукт окисления ^{14}C -оксипролина, прогревают в кипящей бане 25 мин для превращения промежуточного продукта окисления оксипролина в пиррол. После охлаждения к пробам добавляют избыток сухого NaCl (в случае его отсутствия), 12 мл толуола, и смесь встряхивают как и в первый раз. После расслоения фаз 10 мл из толуолового слоя, содержащего радиоактивный пиррол, наносят на колонку с силикагелем. Во всех последующих операциях следует избегать попадания воды в пробы. Предварительно на дно колонки (12×160 мм) со стеклянным фильтром помещают тонкий слой специально очищенного песка и вносят 6 мл суспензии силикагеля в толуоле, приготовленной из расчета 3 г силикагеля на 10 мл толуола. После прохождения 10 мл радиоактивного раствора колонку промывают сначала 5 мл, затем 10 мл толуола. Из полученных 25 мл элюата 10 мл смешивают с 0,5 мл сцинтилляционного раствора для определения радиоактивности пиррола в сцинтилляционном счетчике.

Для определения радиоактивности оксипролина во всем исследуемом гидролизате белков показания счетчика следует пересчитать с учетом разведения проб, потерь в процессе выделения радиоактивных продуктов окисления оксипролина и эффективности счетчика (Е) по формуле:

$$a = X \cdot \frac{100}{E} \cdot \frac{25}{10} \cdot \frac{12}{10} \cdot \frac{3}{2,5} \cdot \frac{5}{4} \cdot \frac{100}{P} \cdot \frac{1}{60},$$

где а — абсолютная радиоактивность ^{14}C -оксипролина во всей исследуемой пробе в расп/с; X — показания счетчика в имп/мин; $^{25}/_{10}$ — поправка на объем элюата, взятый для измерения радиоактивности; $^{12}/_{10}$ — поправка

на объем из второго толуолового экстракта; $\frac{3}{2,5}$ — поправка на объем гидролизата, взятый для определения; $\frac{5}{4}$ — поправка на потерю карбоксильного углерода при превращении ^{14}C -оксипролина в ^{14}C -пиррол; Р — обнаружение оксипролина в виде пиррола по цветной реакции в %.

Для того чтобы определить степень потери оксипролина-носителя в процессе определения оксипролина, т. е. процент обнаружения оксипролина в виде пиррола, проводят колориметрическую реакцию с реактивом Эрлиха. 0,1 мл элюата разбавляют до 5 мл толуолом и быстро смешивают с 2 мл реактива Эрлиха. Окраска развивается при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. Оптическую плотность измеряют при 560 нм против контрольной пробы, содержащей 5 мл толуола и 2 мл реактива Эрлиха.

Одновременно с испытуемыми пробами для цветной реакции берут два стандартных раствора пиррола с содержанием 0,02 и 0,04 мкмоль.

Процент обнаружения оксипролина в виде пиррола (Р) рассчитывают по результатам колориметрического определения по формуле:

$$P = \frac{D}{D_{\text{ст}}} \cdot C \cdot \frac{25}{0,1} \cdot \frac{1}{K} \cdot 100,$$

где D — оптическая плотность пиррола в анализируемой пробе; $D_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандартного раствора пиррола; C — количество микромолей пиррола в стандарте (обычно 0,04 мкмоль); $\frac{25}{0,1}$ — поправка на объем элюата, взятый для колориметрического определения; K — количество оксипролина-носителя в микромолях (в данном случае 15,2 мкмоль).

В группе сходных по составу проб, определяемых в один день, процент обнаружения варьирует не более чем на ± 3 . В пробах, содержащих менее 50 мг аминокислот, процент обнаружения (Р) составляет 45—65. При больших количествах белка он значительно снижается из-за нарушения соотношения между окисляемым материалом и хлорамином-Т. Кроме того, исследуемые пробы не должны содержать более 0,5 мкмоль оксипролина, так как большие количества могут грубо исказить результаты определения пиррола, получаемого из 15,2 мкмоль оксипролина, взятого в качестве носителя.

В данном методе достигается хорошее разделение радиоактивного пролина и пиррола. При исследовании проб, содержащих 80 000 имп/мин ^{14}C -пролина, радиоактивность в толуоловом элюате не превышает активность фона.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КОЛЛАГЕНОВОЙ ПРОЛИН-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Т. В. ЗАМАРАЕВА

Гидроксилирование пролиновых остатков α -цепей коллагена с образованием оксипролина является ферментативной реакцией, катализируемой коллагеновой пролин-гидроксилазой (КФ 1.14.11.2, пролин, 2-оксиглутаратдиоксигеназа). Этот фермент широко распространен во многих тканях животных и его активность изменяется в зависимости от рода ткани, вида животного, его возраста и состояния. Увеличение активности пролин-гидроксилазы отмечено при различных патологических процессах, связанных с повышенным образованием соединительной ткани: при экспериментальном силикозе (Halme e. a., 1970), атеросклерозе (Fuller, Langner, 1970), коллагенозах (Hannuksela e. a., 1970), фиброзе печени (Takeuchi, 1967) и т. д. Поэтому активность фермента может служить некоторым показателем состояния синтезирующей коллаген системы тканей.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Для определения активности коллагеновой пролин-гидроксилазы применяют различные методы в зависимости от характера используемого субстрата. В модельной гидроксилирующей системе могут быть использованы в качестве субстрата различные синтетические пептиды, сходные по строению с коллагеном. При применении синтетических полипептидов (про-про-гли) $_n$ активность фермента определяют по приросту количества оксипролина (Hutton e. a., 1968), измеряемого по цветной реакции.

Однако наиболее часто для определения активности пролин-гидроксилазы используют в качестве субстрата

радиоактивный протоколлаген (негидроксилированный предшественник коллагена). Ферментативная реакция гидроксилирования пролиновых остатков коллагена протекает с участием атмосферного кислорода и требует присутствия ряда кофакторов: α -кетоглутарата, Fe^{2+} и аскорбиновой кислоты. Поэтому в условиях блокирования реакции гидроксилирования (в отсутствие кислорода или при связывании ионов железа α, α' -дипиридилем) в клетках синтезируется богатый пролином предшественник коллагена, не содержащий оксипролина.

Если предшественник синтезируется в присутствии ^3H -пролина, то степень гидроксилирования ^3H -протоколлагена после инкубации его с ферментом определяют по образованию $^3\text{H}_2\text{O}$, отгоняемой из реакционной смеси (Hutton e. a., 1966). При использовании ^{14}C -протоколлагена активность фермента определяют по образованию ^{14}C -оксипролина (см. Т. В. Замараева, с. 265).

Ниже описаны выделение частично очищенной коллагеновой пролин-гидроксилазы, получение ^{14}C -протоколлагена и составление модельной гидроксилирующей системы.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ

Стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком. Центрифуги с охлаждением на 12 000 и 40 000 об/мин. Водяная баня на 37°C с устройством для встряхивания проб. Сцинтилляционный счетчик.

Среда Кребса А (см. Т. В. Замараева, с. 265); α, α' -дипиридил; концентрированная HCl и 6 н. раствор: ^{14}C -пролин, 100 мКи/ммоль; FeSO_4 ; α -кетоглутарат; трис; 2-меркаптоэтанол; катализа; альбумин; глицин; сульфат аммония. Реактивы для определения ^{14}C -оксипролина (см. Т. В. Замараева, с. 265).

ПОЛУЧЕНИЕ ^{14}C -ПРОТОКОЛЛАГЕНА

Хрящевую ткань от 10 куриных эмбрионов 10—11-дневного возраста (большие берцовые, бедренные и тазовые кости) отделяли от окружающих мягких тканей в небольшом объеме среды Кребса и до инкубации помещали в ледяную баню. Выделенную ткань инкубировали при 37°C при встряхивании проб в течение 30 мин

в 5 мл среды Кребса, содержащей 1 мМ α, α' -дипиридил. Затем добавляли 30 мкКи ^{14}C -пролина и инкубацию продолжали еще в течение 2 ч. После окончания инкубации ткань гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в дистиллированной воде и гомогенат диализовали в течение ночи против проточной воды и затем 2—3 ч против дистиллированной. Далее гомогенат центрифугировали при 100 000 g в течение 1 ч. Надосадочную жидкость, содержащую ^{14}C -протоколлаген, прогревали при 90 °C 10 мин и использовали в качестве субстрата при определении активности коллагеновой пролин-гидроксилазы. Растворы протоколлагена хранили замороженными в небольших количествах при —20 °C. Радиоактивность субстрата просчитывали на сцинтилляционном счетчике в системе: 0,1 мл исследуемого раствора, 3 мл метилцеллозольва и 5 мл сцинтилляционного раствора.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННОЙ КОЛЛАГЕНОВОЙ ПРОЛИН-ГИДРОКСИЛАЗЫ

Препарат коллагеновой пролин-гидроксилазы выделяли по методу Халме и соавторов (Halme e. a., 1970b) из 12-дневных куриных эмбрионов. 30—50 куриных эмбрионов после декапитации и промывания гомогенизировали в 2,5 объемах 0,01 М раствора KCl в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Полученный гомогенат центрифугировали при 15 000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость осторожно отсасывали и к ней добавляли при тщательном помешивании небольшими количествами сульфат-аммония до 0,3 насыщения (162 г на 1 л раствора). Образующийся осадок отделяли центрифугированием и отбрасывали, к надосадочной жидкости добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 0,65 насыщения (еще 216 г в расчете на 1 л раствора). Белковую фракцию, выпадающую в осадок при 0,3—0,65 насыщения сульфатом аммония, растворяли в 0,01 М трис-HCl буфере (pH 7,8), содержащем 0,1 М KCl и 0,1 М глицин, и диализовали против того же буфера, дважды меняя раствор, в течение 16—20 ч. Все операции проводили при 4 °C. Концентрацию белка определяли по методу Лоури (Lowry e. a., 1951).

СИСТЕМА ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ^{14}C -ПРОТОКОЛЛАГЕНА

Реакцию гидроксилирования пролиновых остатков ^{14}C -протоколлагена проводили в системе (общий объем проб 4 мл), содержащей: 40 000—50 000 имп/мин* ^{14}C -протоколлагена, 5 мг частично очищенного препарата коллагеновой пролин-гидроксилазы, 0,05 М трис- HCl буфер (pH 7,5), 0,08 мМ FeSO_4 , 0,5 мМ α -кетоглутарат, 2 мМ аскорбиновую кислоту, 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,4 мг каталазы и 2 мг альбумина, прогретого до 90°C 10 мин (Halme e. a., 1970). Пробы инкубировали со встряхиванием при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением равного объема концентрированной HCl .

Гидролиз белков проводили в 6 н. растворе HCl в стеклянных запаянных ампулах при 100°C в течение 20—24 ч. Далее гидролизаты упаривали, несколько раз промывая дистиллированной водой. Сухой остаток растворяли в 3 мл дистиллированной воды. 0,1 мл этого раствора использовали для определения общей радиоактивности белков и 2,5 мл для определения ^{14}C -оксипролина (см. Т. В. Замараева, с. 265). О степени ферментативного гидроксилирования пролиновых остатков ^{14}C -протоколлагена судили по отношению образующегося радиоактивного оксипролина к общей радиоактивности субстрата, выраженному в процентах.

МЕТОД ОСВОБОЖДЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОЛЛАГЕНАЗ ОТ ПРИМЕСЕЙ ДРУГИХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

А. Е. БЕРМАН, Т. А. ОБОРОВА

Для изучения биосинтеза и особенностей первичной структуры коллагена в настоящее время широко используют синтезируемые некоторыми бактериями протеолитические ферменты — коллагеназы, расщепляющие толь-

* По системе СИ радиоактивность изотопа или препарата принято выражать в распадах в секунду (расп/с). В данном случае этого сделать нельзя, поскольку не рассчитывалась эффективность счетчика.

ко коллаген и не активные в отношении других белков. Выпускаемые различными фирмами препараты коллагеназы содержат, как правило, примеси других протеиназ, освобождение от которых совершенно необходимо при использовании коллагеназы для изучения коллагена. Ниже описан метод (Peterkofsky, Diegelman, 1971) очистки с помощью гельфильтрации на сефадексе G-200 некоторых коммерческих препаратов коллагеназы. Метод отличается простотой и высокой эффективностью. Освобождение препаратов коллагеназы от примесей других протеиназ оценивается по степени расщепления радиоактивных белковых субстратов неколлагеновой природы.

ПРЕПАРАТЫ И РАСТВОРЫ

1-й радиоактивный препарат — лиофильно высушенный радиоактивный нейтрально-растворимый коллаген с удельной радиоактивностью 10 000—20 000 имп/мин/мг. Радиоактивный коллаген выделяют из кожи крыс через сутки после введения им меченых глицина или пролина по описанным в литературе методам (Kivirikko, Prosser, 1967). Можно использовать обогащенный радиоактивным коллагеном белковый препарат, выделяемый из костей куриных эмбрионов после их инкубации с меченым пролином (см. Т. В. Замараева, с. 270).

2-й радиоактивный препарат — лиофильно высушенный радиоактивный белковый препарат, не содержащий радиоактивного коллагена. Заведомо не содержащие радиоактивного коллагена препараты можно получить, если использовать в качестве меченого предшественника радиоактивный триптофан, так как молекула коллагена не содержит этой аминокислоты. Мы использовали препарат, выделенный из костей куриных эмбрионов после их инкубации с меченым триптофаном.

0,05 М трис-HCl буфер (pH 7,6), содержащий 1 мМ CaCl_2 (трис-Са буфер).

Гель сефадекса G-200, уравновешенный трис-Са буфером.

0,1% водный раствор альбумина.

50% и 5% растворы трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

5 г ППО и 50 мг ПОПОП растворены в 1 л сцинтилляционного толуола (толуоловый сцинтиллятор).

ВЫПОЛНЕНИЕ АНАЛИЗА

50—100 мг препарата коллагеназы растворяют в 2 мл трис-Са буфера и нерастворившиеся частицы осаждают центрифугированием. Надосадочную жидкость отсасывают и наносят на колонку с сефадексом G-200 (высота 120 см, диаметр 20 мм), уравновешенную и промытую трис-Са буфером. Проводят элюцию тем же буфером со скоростью 6—7 мл/ч, собирая фракции по 3 мл. После завершения элюции (общий объем колонки равен приблизительно 300 мл) измеряют оптическую плотность каждой фракции при 280 нм. Для определения коллагеназной и неколлагеназной протеолитической активностей полученных фракций готовят растворы обоих радиоактивных препаратов с радиоактивным коллагеном (1-й препарат) и без радиоактивного коллагена (2-й препарат) на трис-Са буфере с таким расчетом, чтобы 1 мл раствора содержал 1000—1500 имп/мин. К 1 мл раствора субстрата добавляют 0,05 мл фракции. Для каждой фракции ставят 4 параллельных пробы — по две для каждого субстрата. Кроме того, для каждого субстрата ставят 3 параллельные контрольные пробы, к которым добавляют 0,05 мл трис-Са буфера. Контрольные и опытные пробы инкубируют при 37 °С в течение 90 мин. После инкубации пробы охлаждают в ледяной бане, добавляют к ним по 0,2 мл раствора альбумина (применяется в качестве носителя) и по 0,1 мл 50% раствора ТХУ, пробы перемешивают и оставляют до выпадения осадка. Осадки собирают на миллипоровые фильтры, промывают 5% раствором ТХУ, спиртом, фильтры помещают во флаконы с толуоловым сцинтиллятором и измеряют радиоактивность в сцинтилляционном счетчике. Протеолитическую активность фракций определяют по расщеплению радиоактивного субстрата. Последнее рассчитывают по формуле:

$$\text{расщепление в \%} = 100 \frac{O \cdot 100}{K},$$

где O — среднее значение радиоактивности опытных проб, а K — среднее значение контрольных проб.

Для примера (рис. 28) приводим гельхроматограмму препарата коллагеназы, выпускаемой фирмой «Fergak». В качестве радиоактивного коллагенового субстрата использовали белковый препарат, полученный из костей

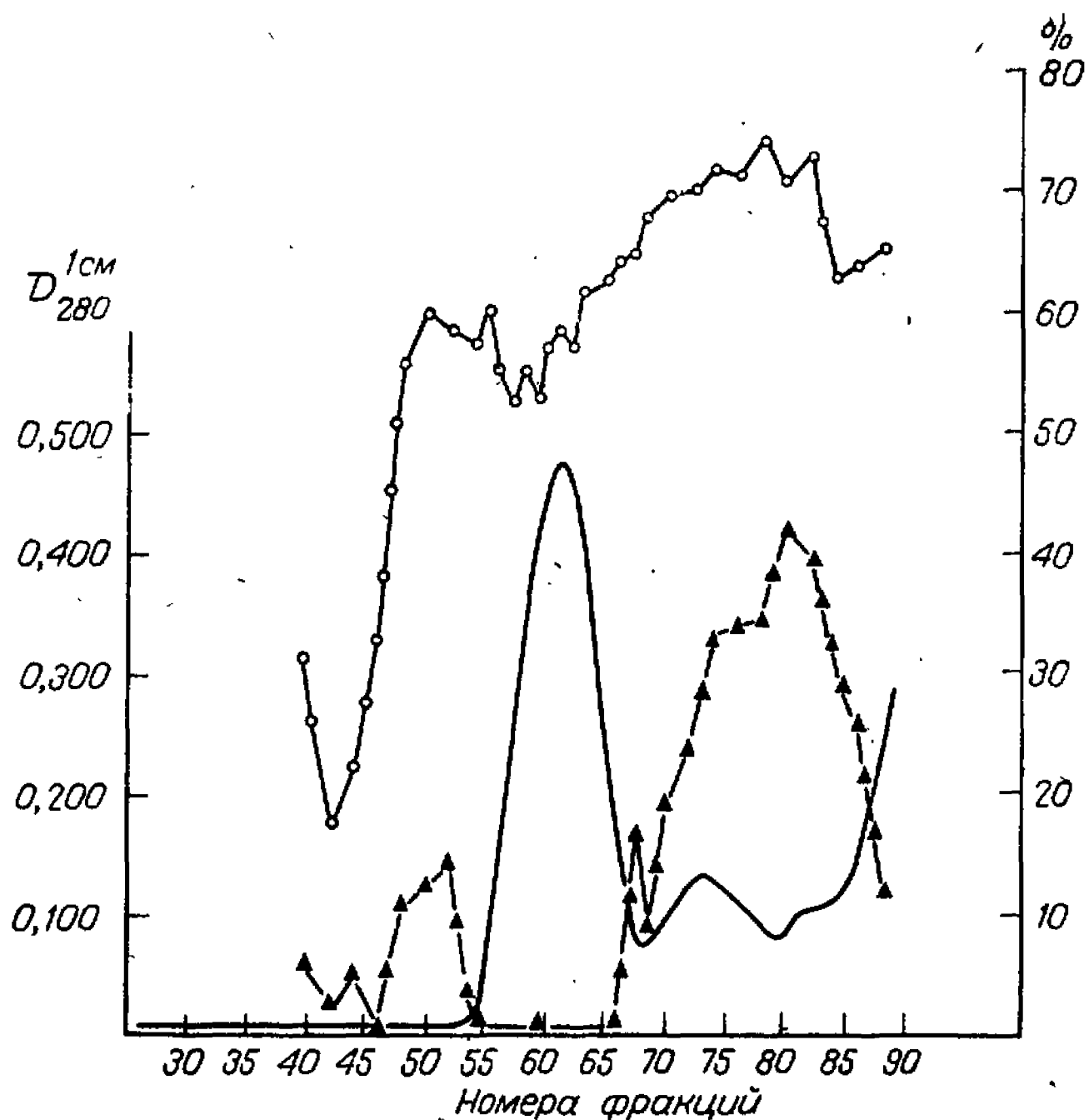


Рис. 28. Элюционный график разделения коллагеназы и других протеиназ при гельфильтрации на сефадексе G-200 препарата коллагеназы (фирмы «Fegak»). Кривая содержания белка (сплошная линия); кривая расщепления ^{14}C -коллагена (кружок—тире); кривая расщепления ^{14}C -неколлагенового белка (треугольник—тире). На ординате — содержание белка в единицах оптической плотности при 280 нм и расщепление радиоактивного субстрата в процентах; на абсциссе — фракции элюата.

куриных эмбрионов после их инкубации с ^{14}C -пролином, а неколлагеновый радиоактивный субстрат выделили из костей после инкубации с ^{14}C -триптофаном. Как видно из рис. 28, фракции 54—65 обладают высокой коллагеназной активностью — они расщепляют 50—60% меченых пролином белков, что соответствует, по литературным данным, общему содержанию радиоактивного коллагена в этом материале. Эти же фракции совершенно не расщепляют выделенные из того же источника радиоактивные белки, меченные ^{14}C -триптофаном.

ЧАСТЬ ТРЕТЬЯ

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВРЕМЕНИ СИНТЕЗА ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

В. Л. ЛЕЙТИН, М. И. ЛЕРМАН

Теоретические исследования по биосинтезу белка последних лет показали, что процесс трансляции можно описать с помощью кинетических параметров: времен или скоростей инициации, элонгации и терминции полипептидной цепи. Эти параметры определяют основные свойства белоксинтезирующей системы, а регуляция биосинтеза белка на уровне трансляции осуществляется путем изменения кинетических параметров. Иногда для характеристики процесса трансляции используют время инициации и время синтеза полипептидной цепи (t_c).

Сопоставление изменений таких свойств белоксинтезирующей системы, как абсолютная скорость синтеза белка, полирибосомный профиль, распределение рибосом вдоль мРНК, кинетика синтеза растущих и завершенных полипептидов с результатами, полученными при компьютерном моделировании трансляции, позволяет получить качественную информацию об изменении кинетических параметров. Методы непосредственного измерения времен элонгации, терминции и t_c подробно разработаны для клеток бактерий, культур клеток эукариотов и бесклеточных систем; для опытов на животных *in vivo* описан лишь способ определения t_c (В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1975а,б; Mathews *et al.*, 1973). Методический принцип измерения времени инициации остается на сегодняшний день не решенным вопросом.

ОБЩИЙ ПРИНЦИП И ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ t_c В ОПЫТАХ НА ЖИВОТНЫХ

Ниже приняты следующие сокращения: t_c — время синтеза полипептида (сумма времен элонгации и терминции), т. е. время, прошедшее с момента присоединения к инициаторному комплексу следующей за инициа-

торной аминоксил-тРНК до момента удаления из полирибосомного комплекса полипептидной цепи после присоединения к ней С-концевой аминокислоты; t_m — время мечения полипептида, т. е. время использования полирибосомами меченой аминокислоты; $t_{мж}$ — время мечения животных, т. е. время инкубации животных с меченой аминокислотой; $ДР_{рп}$ — доля радиоактивности растущих полипептидов, т. е. отношение радиоактивности растущих полипептидов к суммарной радиоактивности растущих и завершенных полипептидов.

Измерение t_c основано на изучении включения меченой аминокислоты в растущие и завершенные полипептиды. Выбор метода принципиально определяется характером изменений удельной активности внутриклеточного фонда (пула) меченой аминокислоты и возможностью точного измерения t_m . Существуют также некоторые частные ограничения: одни методы требуют исследования кинетики мечения на нестационарной стадии ($t_m \leq t_c$), другие — предполагают знание полной аминокислотной последовательности полипептида, его концевых фрагментов или концевых аминокислот.

Определение t_c в опытах на животных по сравнению с определением этого параметра в клетках бактерий, культурах клеток эукариотов и бесклеточных системах осложняется следующими обстоятельствами. При введении животным меченой аминокислоты: 1) удельная активность аминокислотного пула не сохраняется постоянной; 2) имеют место большие индивидуальные колебания величин включения радиоактивных предшественников; 3) t_m существенно отличается от $t_{мж}$, поскольку некоторое время затрачивается на поступление метки во внутриклеточный аминокислотный пул и прекращение синтеза белка после удаления исследуемого органа. Кроме того, хотя это условие не является обязательным, кинетику синтеза полипептидных цепей удобнее исследовать на стационарной стадии мечения ($t_m \geq t_c$).

УРАВНЕНИЯ И УСЛОВИЯ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

$ДР_{рп}$ — форма представления данных по радиоактивности растущих и завершенных полипептидов, не зависящая от удельной активности аминокислотного пула и экспериментальных вариаций включения метки. Теорети-

чески (Haschemeyer, 1969; Brunschede, Bremer 1971) t_c можно вычислить, измеряя $ДР_{рп}$ при заданном t_m :

$$ДР_{рп} = \frac{t_c}{2t_m} \quad \text{для } t_m \geq t_c \quad (1)$$

или исследуя кинетику мечения растущих и завершенных полипептидов:

$$\frac{1}{ДР_{рп}} = \frac{2}{t_c} t_m \quad \text{для } t_m \geq t_c. \quad (2)$$

В последнем случае t_c определяется по наклону прямой на графике зависимости $\frac{1}{ДР_{рп}}$ от t_m .

В опытах на животных $t_m = t_{мж} + t_{осб} - t_{лаг}$, где $t_{мж}$ — время, прошедшее с момента введения животному меченой аминокислоты до начала охлаждения исследуемого органа; $t_{осб}$ — время, проходящее с начала охлаждения до полной остановки синтеза белка; $t_{лаг}$ — время, прошедшее с момента введения меченой аминокислоты до попадания ее во внутриклеточный пул. $t_{мж}$ измеряется непосредственно, но экспериментальное определение $t_{осб}$ и $t_{лаг}$ связано с большими техническими трудностями. Поэтому при фиксированном значении $t_{мж}$ нельзя вычислить t_c по уравнению (1). Однако, поскольку $t_{осб}$ и $t_{лаг}$ являются постоянными величинами, зависящими только от условий опыта, уравнение (2) можно преобразовать в виде, удобном для экспериментального использования (В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1975а, б):

$$\frac{1}{ДР_{рп}} = C_1 + \frac{2}{t_c} \cdot t_{мж} \quad \text{для } t_{мж} \geq t_c - \Delta t, \quad (3)$$

где $C_1 = \frac{2(t_{осб} - t_{лаг})}{t_c} = \frac{2\Delta t}{t_c}$ является константой, t_c — вычисляется из наклона прямой $\frac{1}{ДР_{рп}}(t_{мж})$ и не зависит от Δt .

Опыты по определению t_c из уравнения (3) проводят по следующей схеме: животным вводят меченую аминокислоту, забивают через различные интервалы времени и измеряют $ДР_{рп}$ в клетках исследуемого органа. Указанный метод может быть использован для определения t_c в норме и патологии, а также при экстремальных воздействиях, изменяющих скорость синтеза полипептидной

цели. В последнем случае указанное воздействие следует применять до введения меченой аминокислоты.

При изучении влияния быстро действующих агентов измерять время синтеза полипептидной цепи можно при другой постановке опыта: после мечения в нормальных условиях на стационарной стадии животным вводят агент, изменяющий первоначальную скорость синтеза и исследуют функцию $\frac{1}{\text{ДР}_{\text{рп}}} (t_{\text{мж}})$; t_c вычисляют по наклону прямой $\frac{1}{\text{ДР}_{\text{рп}}} (t_{\text{мж}})$ (В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 19756):

$$\frac{1}{\text{ДР}_{\text{рп}}} = C_2 + \frac{2}{t_c} \cdot t_{\text{мж}} \text{ для } t_{\text{мж}} \geq t_m^0 + t'_{\text{лаг}} - \Delta t, \quad (4)$$

$$\text{где } C_2 = 2 (t_m^0 + t'_{\text{лаг}}) \left(\frac{1}{t_c^0} - \frac{1}{t_c} \right) - \frac{2\Delta t}{t_c}$$

является константой, зависящей от условий опыта; t_c^0 и t_c — соответственно времена синтеза полипептидной цепи в нормальных условиях и при действии агента, изменяющего первоначальную скорость синтеза; t_m^0 — момент введения агента; $t'_{\text{лаг}}$ — время, проходящее с момента введения агента до момента начала его действия; $\Delta t = t_{\text{осб}} - t_{\text{лаг}}$. В отличие от предыдущего этот метод рационально использовать для измерения t_c при сильном ингибировании абсолютной скорости синтеза белка, когда становится существенным вклад меченых полипептидов, синтезируемых не на цитоплазматических полирибосомах (В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1975).

В некоторых случаях для определения относительных изменений t_c нет необходимости в исследовании кинетики мечения растущих и завершенных полипептидов. Из уравнения (1) следует, что при двух различных состояниях белоксинтезирующей системы

$$\frac{\text{ДР}_{\text{рп}}}{\text{ДР}_{\text{рп}}^0} = \frac{t_c}{t_c^0} \quad \text{для } t_{\text{мж}} \begin{cases} \geq t_c - \Delta t \\ > t_c^0 - \Delta t \end{cases} \quad (5)$$

В опытах этого типа параллельным группам животных вводят метку в нормальных условиях или после соответствующего воздействия в течение произвольно выбранного $t_{\text{мж}}$ в интервале

$$t_{\text{мж}} \begin{cases} \geq t_c - \Delta t \\ > t_c^0 - \Delta t \end{cases}$$

и измеряют доли радиоактивности растущих полипептидов. Указанный метод следует применять с осторожностью, поскольку он не позволяет контролировать кинетику синтеза полипептидных цепей на цитоплазматических полирибосомах. Однако его несомненно можно использовать при изменении физиологических условий.

Ниже описываются опыты по определению t_c в экспериментах на мышах *in vivo* в нормальных условиях и при действии ингибиторов трансляции: циклогексимида и ауринтрикарбоновой кислоты.

РЕАКТИВЫ И ЖИВОТНЫЕ

Растворы для инъекций: циклогексимид («Calbiochem»), ауринтрикарбоновую кислоту (лаборатория синтеза органических соединений, Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва) и равномерно меченые L- ^{14}C -лейцин (0,915 мКи/мг) и L-3- ^{14}C -фенилаланин (1,37 мКи/мг) растворяют в 0,14 М растворе NaCl в концентрации, дающей необходимую дозу в объеме 0,5 мл (циклогексимид 0,05—5,0 мг, ауринтрикарбоновая кислота 2,5—25,0 мг, ^{14}C -аминокислоты 10—30 мКи).

Раствор для гомогенизации: 0,25 М сахараза, 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl, 25 мМ трис-HCl pH 7,6; (25 °C).

Растворы для градиента плотности сахарозы: сахароза в необходимой молярной концентрации, 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl, 0,01 % поливинилсульфат, 25 мМ трис-HCl, pH 7,6 (25 °C).

Сцинтиллятор: 3,5 г ППО и 0,1 г ПОПОП растворяют в 1 л толуола.

Подготовка животных. Белые мыши линии BaLb/c (питомник «Столбовая» АМН СССР) с массой тела 23—27 г; перед опытом в течение 16—24 ч не получают пищи.

УСЛОВИЯ МЕЧЕНИЯ

Все растворы для инъекций вводят внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл группам из 3—5 мышей. Дозы приведены в расчете на среднюю массу тела мыши 25 г. Для определения t_c по уравнению (3) мышам вводят растворы 0,14 М NaCl или циклогексимида (0,5 мг), через 20 мин раствор ^{14}C -лейцина (30 мКи) и забивают через 2—15 мин. Для определения t_c по уравнению (4) жи-

вотным вводят ^{14}C -лейцин (30 мкКи), через 2 мин — раствор циклогексимида (5 мг) и забивают через 2—13 мин. Для определения относительных изменений t_c по уравнению (5) мышам вводят растворы 0,14 М NaCl или ауринтрикарбоновой кислоты (2,5—25,0 мг), через 45 мин раствор ^{14}C -фенилаланина (20 мкКи) и забивают через 5 мин.

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ПЕЧЕНИ, ОСТАНОВКА СИНТЕЗА БЕЛКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ $t_{мж}$

После забоя мыши печень извлекают и замораживают в жидком азоте (кинетические эксперименты) или охлаждают погружением в охлажденный раствор для гомогенизации (опыты с фиксированным $t_{мж}$). В некоторых экспериментах замороженную печень хранят в течение 12—20 ч при -20°C . $t_{мж}$ определяют как временный интервал, проходящий с момента введения животным меченой аминокислоты до начала охлаждения печени. Нижний предел $t_{мж}$ ограничивается временем извлечения печени (~ 30 с), верхний предел (15—20 мин) — временем начала секреции вновь синтезированного в печени альбумина в кровь.

ГОМОГЕНИЗАЦИЯ ТКАНИ, ПОЛУЧЕНИЕ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ САХАРОЗЫ ПОСТМИТОХОНДРИАЛЬНОЙ НАДОСАДОЧНОЙ ЖИДКОСТИ

Все последующие операции проводят при $0-4^\circ\text{C}$. Печень промывают, измельчают ножницами и гомогенизируют в цилиндрическом стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (соотношение массы ткани в г к объему буфера в мл для гомогенизации 1 : 3, число ходов пестика — 10). Гомогенат фильтруют через 2 слоя стерильной марли и центрифугируют 15 мин при 15 000 g (ультрацентрифуга Spinco Beckman L-2.50, роторы типа 50 T или 30, 12 000 об/мин, 3°C). Осадок отбрасывают, а полученную надосадочную жидкость (постмитохондриальный супернатант или S_{15}) фильтруют через 4 слоя стерильной марли, добавляют 0,1% раствор поливинилсульфата (конечная концентрация 0,01%) и 13% раствор дезоксихолата натрия (конечная концентрация 1,3%) и после 10 мин инкубации наслаивают на градиент концентрации сахарозы. Применяют два способа фракцио-

нирования S_{15} : 1) ступенчато-линейный градиент (5 мл 2,3 М сахарозы + 45 мл 0,3—1,8 М сахарозы + 2 мл S_{15}), центрифугирование при 68 000 $g_{\text{макс}}$ (ротор SW 25,2, 19 000 об/мин) в течение 12 ч, при 3°C; 2) ступенчато-линейный градиент (1 мл 2,6 М сахарозы + 3 мл 0,5—1,0 М сахарозы + 1 мл S_{15}), центрифугирование при 200 000 $g_{\text{макс}}$ (ротор 50 T, 47 000 об/мин) в течение 90 мин, 3°C.

ИЗМЕРЕНИЕ РАДИОАКТИВНОСТИ РАСТУЩИХ И ЗАВЕРШЕННЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ

После центрифугирования содержимое пробирок с градиентом плотности сахарозы фракционируют по каплям, в каждой фракции измеряют оптическую плотность при 260 нм и получают профиль поглощения в ультрафиолетовом свете. К фракциям градиента с коэффициентами седиментации $>20 S$ добавляют по 0,1 мл немеченого S_{15} , обработанного дезоксихолатом натрия, затем 1 М раствор NaOH до конечной концентрации 0,1 М для гидролиза аминоксил-тРНК и после 10 мин инкубации при 0—4°C добавляют равный объем 10% раствора ТХУ. Через 20—60 мин (0—4°C) преципитаты осаждают на нитроцеллюлозные фильтры Aufs (ЧССР) и измеряют радиоактивность в системе толуол—ППО—ПОПОП на жидкостном сцинтилляционном счетчике Nuclear Chicago Mark II. Радиоактивность растущих полипептидов определяют, суммируя метку в зоне седиментации рибосом и полирибосом ($>60 S$); радиоактивность завершенных полипептидов — в зоне седиментации рибосомных субъединиц и на верху сахарозного градиента (0—60 S); $ДР_{\text{рп}}$ вычисляют из отношения радиоактивности растущих полипептидов к суммарной радиоактивности растущих и завершенных полипептидов. Использование данной техники обеспечивает 100% выход метки в градиенте (отношение общей радиоактивности всех фракций к радиоактивности, внесенной в градиент).

ПОСТРОЕНИЕ ГРАФИКОВ, МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ И ВЫЧИСЛЕНИЕ t_c

Кинетические данные представляют в координатах: $\frac{1}{ДР_{\text{рп}}}$, $t_{\text{мж}}$ в соответствии с уравнениями (3) (рис. 29, а) и 4 (рис. 29, б). Построение прямых $\frac{1}{ДР_{\text{рп}}} (t_{\text{мж}})$ про-

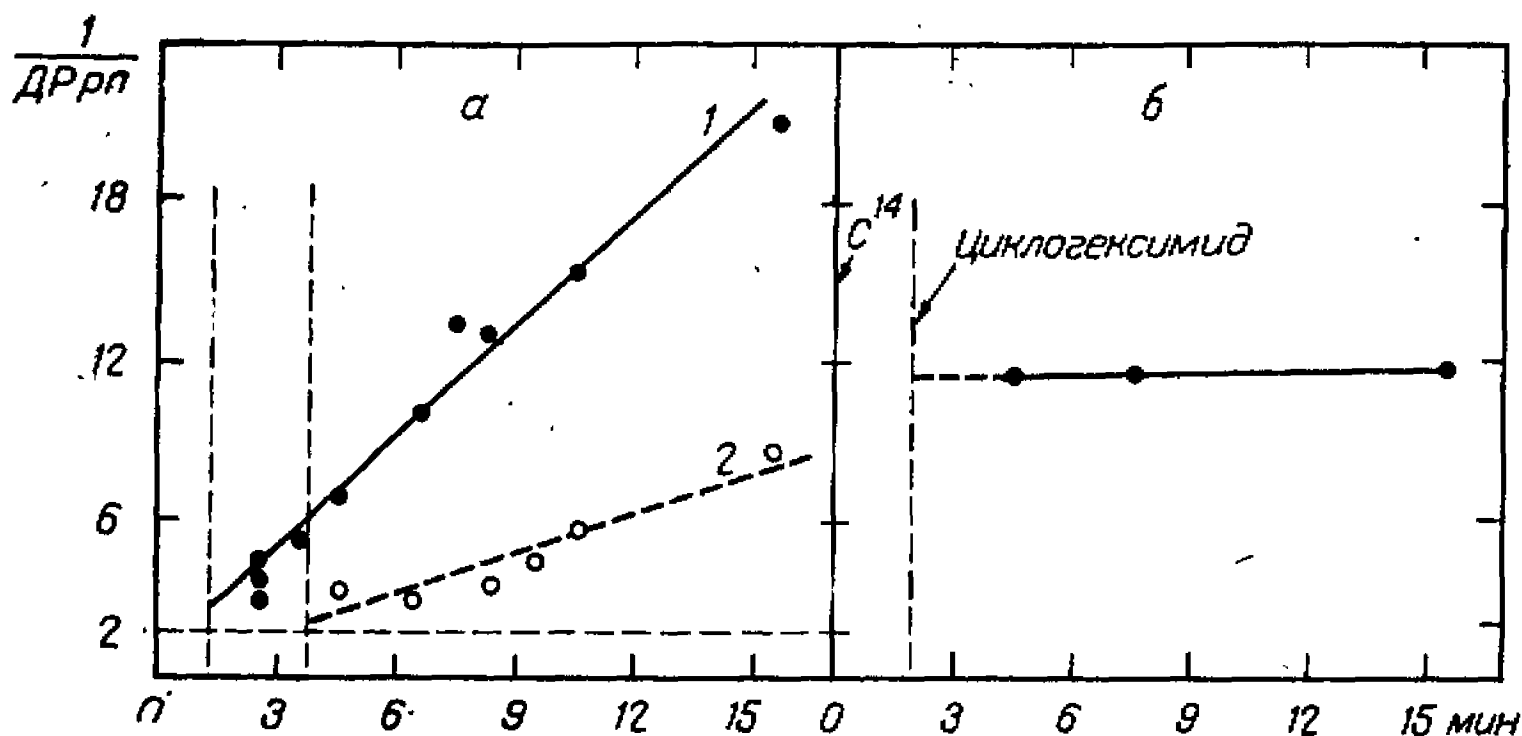


Рис. 29. Определение времени синтеза «средней» полипептидной цепи в нормальных условиях и при действии циклогексимида.

Исследовали кинетику мечения растущих и завершенных полипептидов в клетках печени мыши после введения животным растворов 0,14 М NaCl (а, 1) или циклогексимида; 0,5 мг/25 г массы тела (а, 2) и 5 мг/25 г массы тела (б); t_0 определяли по уравнению (3) — а или по уравнению (4) — б.

На ординате — величина, обратная доле радиоактивности растущих полипептидов; на абсциссе — время инкубации животных с меченой аминокислотой ($t_{мж}$) в минутах.

изводят, обрабатывая результаты методом наименьших квадратов. t_0 вычисляют из наклонов соответствующих прямых: в нормальных условиях t_0 равняется 1,45 мин (см. рис. 29а, прямая 1), введение животным циклогексимида увеличивает t_0 при дозе 0,5 мг до 3,90 мин (см.

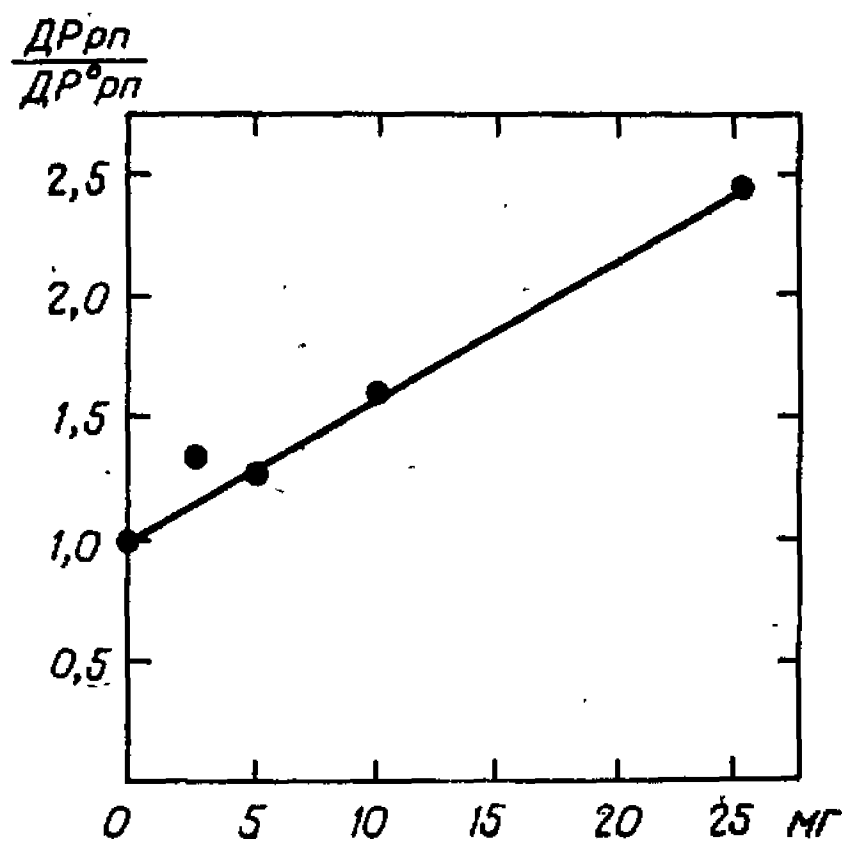


Рис. 30. Определение отношения времени синтеза «средней» полипептидной цепи при действии ауринтрикарбоновой кислоты ко времени синтеза в отсутствие ингибитора трансляции. Мышам вводили растворы 0,14 М NaCl или ауринтрикарбоновой кислоты (2,5—25,0 мг/25 г массы тела) и через 45 мин — C^{14} -фенилаланин; $t_{мж}$ — 5,83 мин; t_0 вычисляли по уравнению (5).

На ординате — отношение доли радиоактивности растущих полипептидов после воздействия к доле до воздействия; на абсциссе — доза ауринтрикарбоновой кислоты в мг на 25 г массы тела мыши.

рис. 29, а, прямая 2), при дозе 5 мг t_c 350 мин (см. рис. 29, б). АуриINTRикарбоновая кислота (2,5—25,0 мг) вызывает линейное увеличение t_c в конечном счете в $2^{1/2}$ раза [расчет по уравнению (5), рис. 30].

МЕТОДЫ АНАЛИЗА МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОВРЕЖДАЮЩИХ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩУЮ СИСТЕМУ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

О. Ю. АБАКУМОВА

В экспериментальной и клинической химиотерапии широко применяются различные противоопухолевые соединения. Наблюдаемый положительный терапевтический эффект, вероятно, можно объяснить тем, что опухолевые клетки более чувствительны к повреждающему действию этих соединений, чем нормальные. Однако природа избирательности действия противоопухолевых соединений в отношении опухолевых клеток по сравнению с нормальными остается в настоящее время невыясненной. Поэтому необходим детальный анализ механизма действия противоопухолевых соединений на различные стороны клеточного обмена, в том числе и на белоксинтезирующую систему.

Белоксинтезирующая система всех клеток является многокомпонентной. Рибосомы играют в этой системе центральную роль, поскольку они организуют весь процесс в целом и катализируют отдельные реакции. Трансляция (собственно синтез белка) подразделяется на три стадии: инициацию — начало белкового синтеза, элонгацию — процесс роста полипептидной цепи и стадию терминирования — освобождение готового полипептида из полирибосомного комплекса.

Повреждающее (обратимое или необратимое) действие противоопухолевых препаратов на белоксинтезирующую систему может быть обусловлено либо тем, что они прямо нарушают функционирование системы, действуя непосредственно на какую-то стадию процесса трансляции, либо тем, что изменяют синтез основных компонентов системы и таким образом нарушают ее нормальную работу.

Чтобы судить о повреждающем действии препаратов на функционирование белоксинтезирующей системы, необходимо измерить прежде всего абсолютную скорость синтеза белка в клетках (естественно, необходимо выяснить и действие различных доз препарата и определить временную зависимость его действия). Для того чтобы получить полное представление об изменении скорости синтеза белка, следует измерить радиоактивность тотальных белков (из гомогената), завершенных полипептидных цепей и незавершенных, так называемых «nascent»-пептидов, еще связанных с рибосомами. Измерения только удельной радиоактивности полирибосом (меченых по растущим пептидам) недостаточно для того, чтобы обнаружить изменение скорости синтеза белка. В тех случаях, когда препарат тормозит либо ускоряет элонгацию белкового синтеза, повреждая тРНК или другие факторы белоксинтезирующей системы, находящиеся в клеточном соке, удельная радиоактивность полирибосом будет соответственно либо обратно пропорциональна скорости синтеза белка, либо не будет изменяться.

Поскольку увеличение или снижение скорости синтеза белка в клетках может быть связано с изменением концентрации аминокислот в цитоплазме (пула аминокислот) (Wannemacher e. a., 1971), необходим анализ удельной радиоактивности пула используемых меченых аминокислот в кислоторастворимой фракции гомогената тканей.

После того как установлено, что изучаемый препарат действует непосредственно на процесс трансляции, необходимо выяснить, на какую стадию трансляции он влияет. При блокировании инициации белкового синтеза снижается количество работающих полирибосом и накапливаются одиночные нетранслирующие монорибосомы. Эти изменения можно обнаружить, анализируя полирибосомный материал в градиенте плотности сахарозы в растворах с высокой и низкой ионной силой, используя импульсное мечение белка аминокислотой. Нетранслирующие монорибосомы в градиенте плотности с высокой ионной силой — обнаруживают себя, диссоциируя на 40 S- и 60 S-субъединицы.

При повреждении тРНК и факторов белкового синтеза, находящихся в клеточном соке, может замедлиться процесс элонгации белковой цепи, что при нормальной инициации приведет к увеличению количества рибосом,

связанных с одной мРНК, т. е. полирибосомы станут «тяжелее». Подобное перераспределение рибосом в полирибосомном материале можно обнаружить при его анализе в градиенте плотности сахарозы.

Замедление или ускорение процесса трансляции и соответственно элонгации белкового синтеза можно установить, непосредственно измерив время синтеза полипептидной цепи (В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, с. 277). Можно использовать также метод Хашемейера (Haschemeyer, 1961; Mathews e. a., 1973).

В осуществлении последней стадии процесса трансляции — стадии терминации — участвуют белковые факторы терминации. Их повреждение противоопухолевыми препаратами может нарушить нормальное освобождение уже готовой полипептидной цепи и рибосомы из комплекса мРНК-рибосома. В силу этого на мРНК может оказаться значительно большее, чем обычно, число работающих рибосом, что увеличит массу полирибосомы. Подобное изменение можно обнаружить, анализируя полирибосомный материал в градиенте плотности сахарозы. Однако те же изменения полирибосомного профиля наблюдают и при нарушении стадии элонгации, что затрудняет определение повреждений на стадии терминации.

Нарушение процесса трансляции может быть обусловлено повреждением одного или многих компонентов белоксинтезирующей системы. Чтобы выяснить это, используют три типа бесклеточных систем синтеза белка: 1) нефракционированную (грубую) систему, содержащую постмитохондриальную или постмикросомную надосадочную жидкость и необходимые добавки, 2) систему, реконструированную из полирибосом и клеточного сока, и 3) систему, стимулируемую добавлением тРНК (Абакимова и др., 1974).

Противоопухолевые препараты могут также нарушать синтез компонентов белоксинтезирующей системы. Нарушение синтеза РНК, рибосомных белков, белковых факторов трансляции (одного или нескольких) неизбежно приведет к изменению функционирования белоксинтезирующей системы. Дефицит компонентов белоксинтезирующей системы при подавлении их синтеза будет проявляться прямо пропорционально времени жизни того или иного компонента, поэтому повреждающее влияние препаратов в этом случае, вероятно, правильнее всего определять в экспериментах с длительной экспозицией

препарата. Полученные ткани целесообразно фракционировать до субклеточных структур и анализировать в бесклеточной системе белкового синтеза, используя экзогенные добавки компонентов из тканей животных, не обработанных препаратом.

Ниже предложены методы, которые позволяют определить в общих чертах некоторые точки приложения противоопухолевых препаратов при их действии на белок-синтезирующую систему клеток.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА НА СКОРОСТЬ СИНТЕЗА БЕЛКА В КЛЕТКАХ

Реактивы: буфер А: 0,25 М сахароза, 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl , 25 мМ трис- HCl буфер (рН 7,6).

0,1% раствор поливинилсульфата (ПВС).

20% раствор тритона X-100.

10%, 15% и 50% растворы сахарозы, приготовленные на растворе по солевому составу, аналогичному буферу А.

0,2 М раствор $NaOH$.

Эфир серный (для наркоза).

^{14}C -аминокислоты (ЧССР, ~100 мКи/ммоль).

Миллипоровые фильтры или мембранный сынпор Aufs (№ 3), ЧССР.

Толуоловый сцинтиллятор, содержащий 3,5 г ППО и 0,1 г ПОПОП в 1 л толуола.

Жидкость Брея, содержащая 400 мл диоксана, 100 мл метанола или этанола, 10 мл этиленгликоля, 30 г нафталина, 2 г ППО и 0,2 г ПОПОП.

5% и 10% растворы ТХУ.

Используют животных-опухоленосителей и контрольных здоровых животных. Необходимо следить, чтобы в опухолях не наблюдалось участков некроза. Известную или определенную экспериментально полулетальную дозу (LD_{50}) препарата принимают как максимальную и берут соответственно меньшие концентрации (обычно 5—6 доз). Длительность экспозиции препарата устанавливают, исходя из задач эксперимента.

Ход анализа. При предварительном введении препарата целесообразно проконтролировать, не оказывает ли он повреждающего действия на структурную целостность полирибосом. С этой целью проводят анализ полирибосомного материала или в аналитической ультрацент-

рифуге, снабженной шлирен-оптикой, или в препаративной ультрацентрифуге, в градиенте плотности сахарозы, и получают так называемый профиль полирибосом.

В опытах применяют импульсную аминокислотную метку. ^{14}C -аминокислоты (~ 250 мкКи/кг массы тела) вводят либо внутрибрюшинно (на 5—10 мин), либо в воротную вену (на 1—2 мин). Животных забивают декапитацией, органы и опухоль извлекают, взвешивают, промывают ледяной водой, затем буфером А и гомогенизируют в этом буфере (в 3 объемах) в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Полирибосомы выделяют по методу В. Л. Лейтина и М. И. Лермана (1969), измеряют их удельную радиоактивность и сравнивают с удельной радиоактивностью полирибосом из аналогичных тканей контрольных животных. Для измерения радиоактивности тотальных белков клеток берут пробы гомогената.

Радиоактивность завершенных полипептидных цепей определяют после следующей процедуры: к постмитохондриальной надосадочной жидкости (S_{15}) добавляют ПВС и тритон X-100 до конечной концентрации соответственно 0,01 и 2%. Затем наслаивают 3 мл S_{15} на 2 мл 15% раствора сахарозы, содержащего те же соли, что и буфер А. Центрифугируют при 105 000 g (ротатор Ti 50 центрифуги «Спинко» L 2.50 при 40 000 об/мин) в течение 2½ ч при 3°C. Надосадочную жидкость сливают и из нее берут пробы для определения количества белка (по Лоури), ДНК (по А. С. Спирину, 1958) и радиоактивности завершенных полипептидных цепей. Находящиеся в осадке полирибосомы суспендируют в воде, содержащей 0,01% ПВС, и берут пробы для определения концентрации материала и удельной радиоактивности. Все пробы освобождают от сорбированной радиоактивности и ^{14}C -аминоацил-тРНК при добавлении равного объема 0,2 М раствора NaOH и инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре. Радиоактивность проб измеряют после осаждения их 10% раствором ТХУ на миллипоровые фильтры в толуюловом сцинтилляторе. Кислоторастворимую фракцию гомогената тканей собирают для определения удельной радиоактивности пула используемых меченых предшественников. Для удаления ТХУ кислоторастворимую фракцию промывают эфиром до pH 5,0, лиофилизируют и исследуют в аминокислотном анализаторе. Фракции, содержащие меченые аминокислоты, собирают, их радиоактивность измеряют в жидкости Брея.

Результаты выражают в имп/мин на 1 г сырой массы органа и на 1 мг белка.

При определении временной зависимости действия препарата экспериментально выбранную (либо терапевтическую) дозу вводят с различной экспозицией от нескольких часов до нескольких суток. Мечение и обработку материала проводят аналогично описанным выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА НА ПРОЦЕСС ИНИЦИАЦИИ СИНТЕЗА БЕЛКА

Полирибосомный меченый по растущим пептидам материал наслаивают на градиент концентрации сахарозы от 10 до 50% с солевым составом буфера А (раствор с низкой ионной силой) и с таким же солевым составом, не содержащим 0,5 М КСl (раствор с высокой ионной силой). Центрифугируют при 4000 g (бакет-ротор SW 25.2 центрифуги «Спинко» при 17 000 об/мин) в течение 14 ч при 10°C. После прокалывания дна пробирки с градиентом и разделения содержимого пробирки на фракции по 40 капель в каждой («раскапывание») измеряют оптическую плотность при 260 нм в каждой фракции, вычерчивают ультрафиолетовый профиль градиента и делят его на зоны: тяжелый материал (>80 S), монорибосомы (80 S) и зоны субъединиц (60 S и 40 S). Определяют процентное отношение каждой зоны ко всему материалу в градиенте, соотношение масс 80 S-, 60 S- и 40 S-частиц, удельную радиоактивность зон. Таким образом составляют характеристику полирибосомного материала. Полученные результаты сравнивают с аналогично обработанными полирибосомами из тканей контрольных животных.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА НА СИНТЕЗ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ РНК

Реактивы: буфер Б: 10 mM NaCl, 5 mM трис-HCl буфер (pH 7,6).

5% и 20% растворы сахарозы, приготовленные на буфере Б.

0,2 М раствор ЭДТА.

10% раствор додецилсульфата натрия.

1% раствор дрожжевой РНК.

^{14}C -оротовая кислота (12—15 мКи/ммоль, отечественного производства).

Миллипоровые фильтры Auf β s (№ 3), ЧССР.

5% и 10% растворы ТХУ.

При расшифровке механизма действия противоопухолевых препаратов необходимо изучение синтеза различных классов РНК. Прежде всего исследуют влияние препарата на синтез, транспорт в цитоплазму и включение в полирибосомы мРНК. Для этого животным вводят препарат, через 1 ч после этого вводят ^{14}C -оротовую кислоту (200 мКи/кг массы тела) и еще через 1 ч животных декапитируют. Обработка ткани, выделение полирибосом и измерение их радиоактивности описаны выше. Результаты рассчитывают на мг полирибосом.

Для определения действия препарата на синтез РНК в ядре и транспорт в цитоплазму применяют следующую схему опыта (измерение радиоактивности полирибосом):

Условия эксперимента	Ожидаемый результат
Введение ^{14}C -оротовой кислоты на 2 ч контрольным животным	Синтез и транспорт РНК в цитоплазму в контроле за 2 ч экспозиции
Введение ^{14}C -оротовой кислоты на 1 ч, затем препарата на 1 ч	Влияние препарата на транспорт в цитоплазму синтезированной до его введения РНК
Введение ^{14}C -оротовой кислоты на 1 ч контрольным животным	Синтез и транспорт РНК в контроле за 1 ч
Введение препарата на 1 ч, затем ^{14}C -оротовой кислоты на 1 ч	Влияние препарата на синтез РНК в течение 1 ч

По отношению удельной радиоактивности полирибосом, полученной во 2-м опыте, к их удельной радиоактивности, полученной в 1-м опыте, определяют вызванное препаратом изменение транспорта РНК в цитоплазму, а по отношению таких же данных 4-го опыта к данным 3-го — влияние препарата на синтез РНК.

Для определения действия препарата непосредственно на синтез РНК в ядрах клеток животным вводят пре-

парат и ^{14}C -оротовую кислоту, гомогенат такней получают, как описано выше, затем его центрифугируют 10 мин при 800 g и 4°C : Осадок ядер после промывания в буфере А суспендируют в том же буфере и берут пробы для определения количеств ДНК и РНК (М. Г. Трудюлюбова, с. 313) и радиоактивности РНК.

Кислоторастворимые экстракты гомогената используют для определения удельной радиоактивности метаболитов меченого предшественника РНК. При применении ^{14}C -оротовой кислоты измеряют радиоактивность ^{14}C -уридиловой кислоты после ее выделения по Катцу и Комбу (Katz, Comb, 1963).

Детальную характеристику действия препарата на синтез отдельных классов РНК получают, анализируя РНК полирибосом в градиенте плотности сахарозы. Для выделения РНК из полирибосом их суспендируют в буфере Б, к суспензии добавляют додецилсульфат натрия до 0,5% и ЭДТА до 5 мМ, после чего раствор инкубируют при 37°C в течение 1 мин. Для анализа профилей РНК используют градиент концентрации сахарозы 5—20%, приготовленный на буфере Б. Центрифугируют в течение 15 ч при 50 000 g (бакет-ротатор SW 25.2 центрифуги «Спинко», 20 000 об/мин) при 3°C . Фракции, соответствующие пикам в градиенте, содержащие рРНК и мРНК, используют для определения удельной радиоактивности РНК после осаждения материала 10% раствором ТХУ. Для количественного осаждения к пробам перед добавлением ТХУ приливают по 3 капли 1% раствора дрожжевой РНК. Осажденный материал наносят на миллипоровые фильтры и измеряют радиоактивность. Результаты выражают в имп/мин на мг РНК и ДНК клеток.

Приведенные выше методики, разумеется, не исчерпывают всего многообразия методов, которые могут быть применены, однако их оказалось вполне достаточно для обнаружения различной чувствительности белоксинтезирующей системы нормальных и опухолевых клеток к повреждающему действию алкилирующих противоопухолевых соединений (нитрозомочевины) (О. Ю. Абакумова и др., 1973).

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОЛИРИБОСОМ

Е. В. СИДОРОВА, М. Г. ТРУДОЛЮБОВА

Для решения таких вопросов, как изучение структуры мРНК, синтез индивидуальных генов, контролирующих синтез определенного белка, выяснение механизмов и скорости трансляции и др., необходимо иметь индивидуальные полирибосомы. Наиболее пригодными для извлечения индивидуальных полирибосом являются специфические методы, основанные на взаимодействии антитела с растущими на полирибосомах цепями данного белка. Частный вариант этого метода — осаждение полирибосом антисывороткой или чистым антителом к синтезируемому ими белку в присутствии носителя (копреципитация) (Palmiter *е. а.*, 1972, и др.). Однако получение нативных полирибосом (и мРНК) сталкивается при этом с рядом трудностей (Halme *е. а.*, 1971). Некоторые из них можно избежать, используя для выделения индивидуальных полирибосом специфические иммуносорбенты типа сэндвич (Г. И. Дризлих, А. Е. Гурвич, 1964), содержащие ковалентно связанный комплекс антиген—антитело, роль антигена, в котором играет белок, идентичный синтезируемому на полирибосомах. Ниже описан метод выделения полирибосом с помощью специфических сэндвич-сорбентов, на примерах рибосом, синтезирующих альбумин и иммуноглобулин.

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИРИБОСОМ

В опытах используют мышей с перевиваемой плазмоцитомой МОРС-21А, продуцирующей иммуноглобулин ($\gamma 1$ ж-типа) и крыс.

Полирибосомы из клеток плазмоцитомы и печени выделяют по модифицированной методике (Blobel, Sabatini, 1971). Используют полирибосомы, меченые: 1) по рРНК, 2) по мРНК и 3) по растущим полипептидным цепям. В первом случае рибосомы выделяют через 20—24 ч после внутрибрюшинного введения животным 100 мккюри ^{14}C -оротовой кислоты на крысу или 10 мккюри ^{14}C -уридина на мышь. Во втором случае полирибосомы выделяют через 4 ч после внутрибрюшинного введения метки; за 1 ч до выделения полирибосом животным

внутрибрюшинно вводят актиномицин D в дозе 50 мкг на 200 г массы тела. В третьем случае рибосомы выделяют через 5 мин после внутрибрюшинного или внутриопухолевого введения 10 мкг и ^{14}C -гидролизата хлореллы или ^{14}C -лейцина.

АНТИГЕНЫ И АНТИТЕЛА

Иммуноглобулин мыши (ИГМ) выделяют из сыворотки мышей с плазмоцитомой по Поттеру с соавт. (Potter e. a., 1965), сывороточный альбумин (САК)—из сыворотки крыс по Корнеру (Corner, 1962).

Антисыворотки к ИГМ и САК получают от кроликов. Животных иммунизируют 300—500 мкг ИГМ или САК в полном адъюванте Фрейнда в задние подколенные лимфатические узлы и реиммунизируют через 1 мес после этого 1 мг белка, введенным в три точки: внутривенно (0,2 мг), в один из задних лимфатических узлов и в область противоположной передней лопатки (по 0,4 мг). Кровь берут из ушной вены через 7—14 дней после реиммунизации. От одного кролика за один прием следует брать не более 40 мл крови; на протяжении указанного периода кровь можно брать каждые 2—3 дня. Реиммунизацию можно повторять каждые 3—5 мес, предварительно убедившись в отсутствии в сыворотке животных антител к вводимым антигенам.

Содержание в антисыворотках антител к ИГМ и САК определяют по методу Гурвича и соавт. (А. Е. Гурвич и др., 1962). На 7—14-й день после реиммунизации оно составляет в среднем 1,0—1,5 мг/мл.

Из полученных антисывороток с помощью высаливания при 0,4 насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и фракционирования на ДЭАЭ-целлюлозе в 17,5 мМ Na-фосфатном буфере (рН 6,5) выделяют фракцию кроличьих гамма-глобулинов (ГГК). Чистоту препаратов проверяют иммуноэлектрофоретически (В. С. Цветков, 1968). В них определяют содержание антител, которое обычно составляет 10% препарата ГГК. В опытах используют только иммуноэлектрофоретически чистые препараты ГГК.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИММУНОСОРБЕНТОВ И СЭНДВИЧ-СОРБЕНТОВ

ИГМ и САК присоединяют к суспензии диазотированной аминоцеллюлозы; готовые иммуносорбенты (ИГМ-сорбент и САК-сорбент) суспендируют в 0,85% растворе

NaCl из расчета 10—15 мг/мл (по сухой массе) и хранят при 4 °С. При длительном хранении к иммуносорбентам рекомендуется добавлять консерванты—мертиолат или азид натрия. Емкость иммуносорбентов в отношении антител определяют по Гурвичу (А. Е. Гурвич и др., 1962). Обычно для ИГМ- и САК-сорбентов она составляет ~300 мкг антител/мг иммуносорбента.

ИГМ- и САК-сэндвичи получают, насыщая ИГМ- и САК-сорбенты соответственными антителами; для этого иммуносорбенты перемешивают с содержащим достаточное количество антител раствором ГГК при комнатной температуре, 4—5 раз отмывают при центрифугировании 0,85% раствором NaCl и 2—3 раза стандартным буфером (0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4, содержащий 0,15 М KCl и 0,015 М MgCl₂). Полноту насыщения контролируют, определяя наличие антител в надосадочной жидкости методом двойной диффузии в агаре (А. И. Гусев, 1968) или по реакции коагпреципитации. Готовые сэндвич-сорбенты суспендируют в стандартном буфере из расчета 5 мг/мл. Сэндвич-сорбенты рекомендуется готовить небольшими порциями, рассчитанными на 1—2 опыта и хранить не больше 2 нед, так как их емкость при хранении снижается.

ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОЛИРИБОСОМ

Полирибосомы суспендируют в стандартном буфере и непосредственно перед использованием осветляют центрифугированием в течение 20 мин на холоду при 4—6000 g. Концентрацию полирибосом определяют спектрофотометрически, принимая $E_{1\%}^{1\text{см}, 260\text{nm}} = 130$; удельную активность препарата определяют, осаждая полирибосомы на холоду 5% раствором ТХУ в присутствии носителя. В опытах используют материал, выделенный либо в тот же день, либо накануне. Кратковременное хранение полирибосом при —20 °С допускается только в виде осадка, быстро замороженного в жидком азоте.

В стеклянные центрифужные пробирки вносят ИГМ- или САК-сэндвичи, добавляют к ним меченые полирибосомы плазмоцитомы или печени (в общем объеме 2 мл) в соотношении, которое выбирается после определения емкости сорбента, и инкубируют при 0 °С в течение 30 мин, постоянно перемешивая пробы. По окончании срока инкубации сэндвич-сорбенты отделяют от надоса-

дочной жидкости 3-минутным центрифугированием при 2—3000 g, отмывают стандартным буфером и количественно переносят на миллипоровые фильтры для определения сорбированной радиоактивности. После высушивания радиоактивность проб измеряют на сцинтилляционном счетчике.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕМКОСТИ СЭНДВИЧ-СОРБЕНТОВ В ОТНОШЕНИИ ПОЛИРИБОСОМ

Для определения емкости сэндвич-сорбентов к равным порциям (1—2 мг) сорбентов добавляют возрастающие количества полирибосом, меченных по рРНК или растущим пептидам, обрабатывают пробы, как описано выше, и строят кривые зависимости связанной радиоактивности от количества внесенных полирибосом. Емкость сэндвич-сорбента выражают через максимальное количество полирибосом, способных присоединиться к 1 мг иммуносорбента; для ИГМ- и САК-сэндвичей величины емкости равны ~200—300 мкг полирибосом на 1 мг иммуносорбента.

Вся используемая химически чистая посуда непосредственно перед опытом прокаливается при 200 °С в течение 1 ч.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОЛИРИБОСОМ В ОБЩЕМ КОЛИЧЕСТВЕ КЛЕТОЧНЫХ ПОЛИРИБОСОМ

Для этого к возрастающим количествам иммуносорбента (1—5 мг/пробу) добавляют постоянные количества клеточных полирибосом, меченных по растущим пептидам (для данных сорбентов не более 500 мкг на пробу), и, определяя затем процент связанной радиоактивности на сэндвич-сорбентах от внесенной в пробу, рассчитывают долю полирибосом, синтезирующих данный белок. Наличие постоянного процента сорбции полирибосом при большом избытке сэндвич-сорбента в пробе указывает на специфический характер связывания.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ СОРБЦИИ

Для доказательства специфичности связывания сорбцию полирибосом на специфических сэндвич-сорбентах сравнивают с сорбцией их на иммуносорбентах, в состав

которых не входят антитела к синтезирующимся на этих полирибосомах полипептидным цепям. Полирибосомы плазмоцитомы или печени, меченные по рРНК или растущим пептидам (100—500 мкг), добавляют к 1 мг ИГМ- и САК-сэндвичей и ИГМ- и САК-сорбентов, определяют прирост радиоактивности на всех иммуносорбентах и рассчитывают процент сорбции на специфическом для данных полирибосом и на неспецифических сорбентах. Сорбция считается специфической, если она превышает сорбцию на «чужих» иммуносорбентах не менее чем в 10 раз.

Прямым доказательством специфичности сорбции является наличие конкурентного торможения присоединения полирибосом к сэндвич-сорбентам соответственными растворимыми антигенами. В пробы, содержащие по 1 мг сэндвич-сорбентов и 100—500 мкг полирибосом, добавляют по 100 мкг белка, идентичного синтезируемому на полирибосомах или постороннего. Добавление гомологичного белка снижает сорбцию полирибосом на 50—60%, «чужой» белок в этой концентрации на специфическую сорбцию не влияет (табл. 27).

Таблица 27

Торможение присоединения полирибосом к сэндвич-сорбентам гомологичным и гетерологичным белками (добавлено 100 мкг)

Источник полирибосом	Количество и радиоактивность полирибосом в пробе		Добавленный белок	Связанная радиоактивность, имп/мин/мг	Торможение сорбции, %
	мкг	имп/мин			
Плазмоцитома мыши МОРС-21А	550	5 742	—	130	—
	550	5 742	ИГМ	51	63
	550	5 742	САК	196	0
Печень крысы	100	14 272	—	422	—
	100	14 272	ИГМ	395	7
	100	14 272	САК	195	55

ПРИРОДА ПОЛИРИБОСОМНОГО МАТЕРИАЛА, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА СОРБЦИЮ ПОЛИРИБОСОМ НА СЭНДВИЧ-СОРБЕНТАХ

Для выяснения того, обусловлена ли наблюдаемая сорбция полирибосом растущими на них полипептидными цепями или нет, меченые по растущим пептидам по-

лирибосомы перед добавлением к сэндвич-сорбентам обрабатывают пурамицином (Blobel, Sabatini, 1971), обладающим способностью «снимать» с полирибосом растущие пептидные цепи.

Такая обработка на 50—70% снижает сорбцию полирибосом плазмоцитомы и печени на ИГМ- и САК-сэндвичах соответственно.

ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ мРНК И РАСТУЩИХ ПЕПТИДОВ

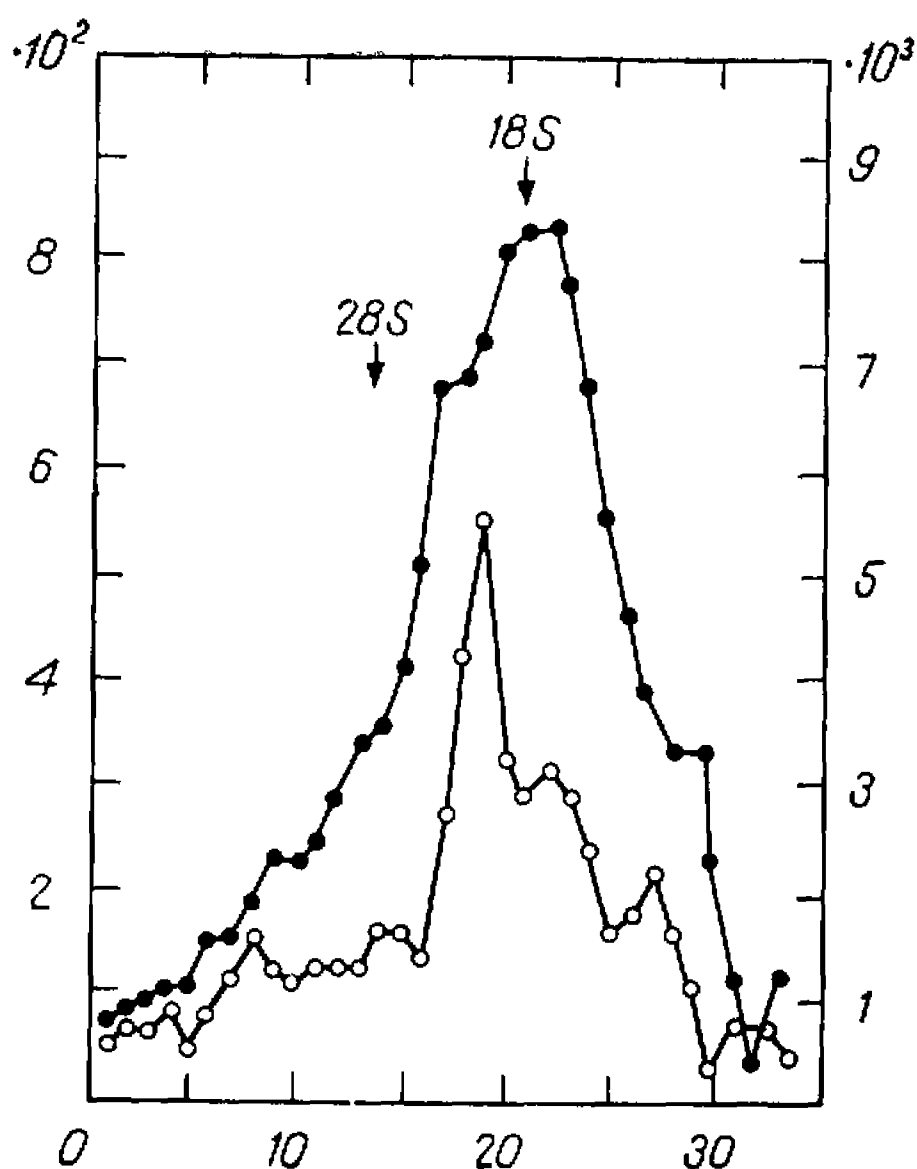
Для выделения ^{14}C -мРНК к 10—15 мг ИГМ- или САК-сэндвичей добавляют по 5—10 мг полирибосом плазмоцитомы или печени, меченных по мРНК (см. с. 293). Извлечение индивидуальных полирибосом проводят в избытке иммуносорбентов. Пробы обрабатывают, как описано выше, отмывают от несвязавшихся полирибосом (5—6 раз по 5—6 мл стандартного буфера), добавляют к отмытому осадку 0,8 мл 0,02 М раствора ЭДТА, перемешивают и инкубируют смесь 5 мин при 0°C. Затем пробы переносят в водяную баню с температурой 37°C; добавляют 0,2 мл 20% раствора додецилсульфата натрия, хорошо перемешивают и инкубируют еще 1—2 мин при 37°C; после этого пробы центрифугируют при 3—4000 g в течение 5 мин при комнатной температуре, надосадочную жидкость переносят в пробирку и обработку осадка повторяют еще 2 раза. Все элюаты объединяют и после определения в них общей радиоактивности анализируют мРНК в градиенте плотности сахарозы. Одновременно проводят анализ исходного образца мРНК.

Линейный градиент плотности создают 15—30% сахарозой, приготовленной на 0,01 М трис-HCl, содержащем 0,1 М NaCl, 0,5% додецилсульфат натрия и 5 мМ ЭДТА. Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы проводят при 22°C в течение 17 ч при 75 500 g.

Для выделения растущих пептидных цепей аналогичной обработке подвергают полирибосомы, меченые по растущим пептидам. В полученных элюатах определяют также общую радиоактивность. Элюаты концентрируют с помощью полиэтиленгликоля и анализируют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (Palmiter e. a., 1971).

Рис. 31. Седиментационный профиль мРНК из альбуминовых (белые кружки) и тотальных (темные кружки) полирибосом печени крыс.

На ординате — радиоактивность в имп/мин· 10^2 (альбуминовые полирибосомы), в имп/мин· 10^3 (тотальные полирибосомы); на абсциссе — фракции градиента плотности сахарозы по номерам.



В качестве иллюстрации на рис. 31 приведены кривые, полученные при анализе индивидуальных и тотальных мРНК, выделенных из клеток печени крыс. На рис. 32 приведены результаты электрофоретического анализа соответствующих растущих пептидов.

В заключение следует указать, что использование для выделения индивидуальных полирибосом и мРНК сэндвич-сорбентов представляет ряд преимуществ по сравнению с методом копреципитации: 1) сэндвич-сорбенты не содержат РНК-азы (в отличие от антисывороток) и не вызывают деградации полирибосом, 2) использование иммуносорбентов позволяет, кроме того, резко сократить время фракционирования полирибосом и тем самым вероятность разрушения мРНК, 3) с помощью иммуносорбентов сэндвич-типа можно извлекать любые количества полирибосом, не устанавливая предварительно эквивалентных соотношений между антителами и немеченым носителем, и, наконец, 4) с помощью сэндвич-сорбентов можно извлекать индивидуальные полирибосомы из тех объектов, где относительное содержание их не превышает нескольких процентов.

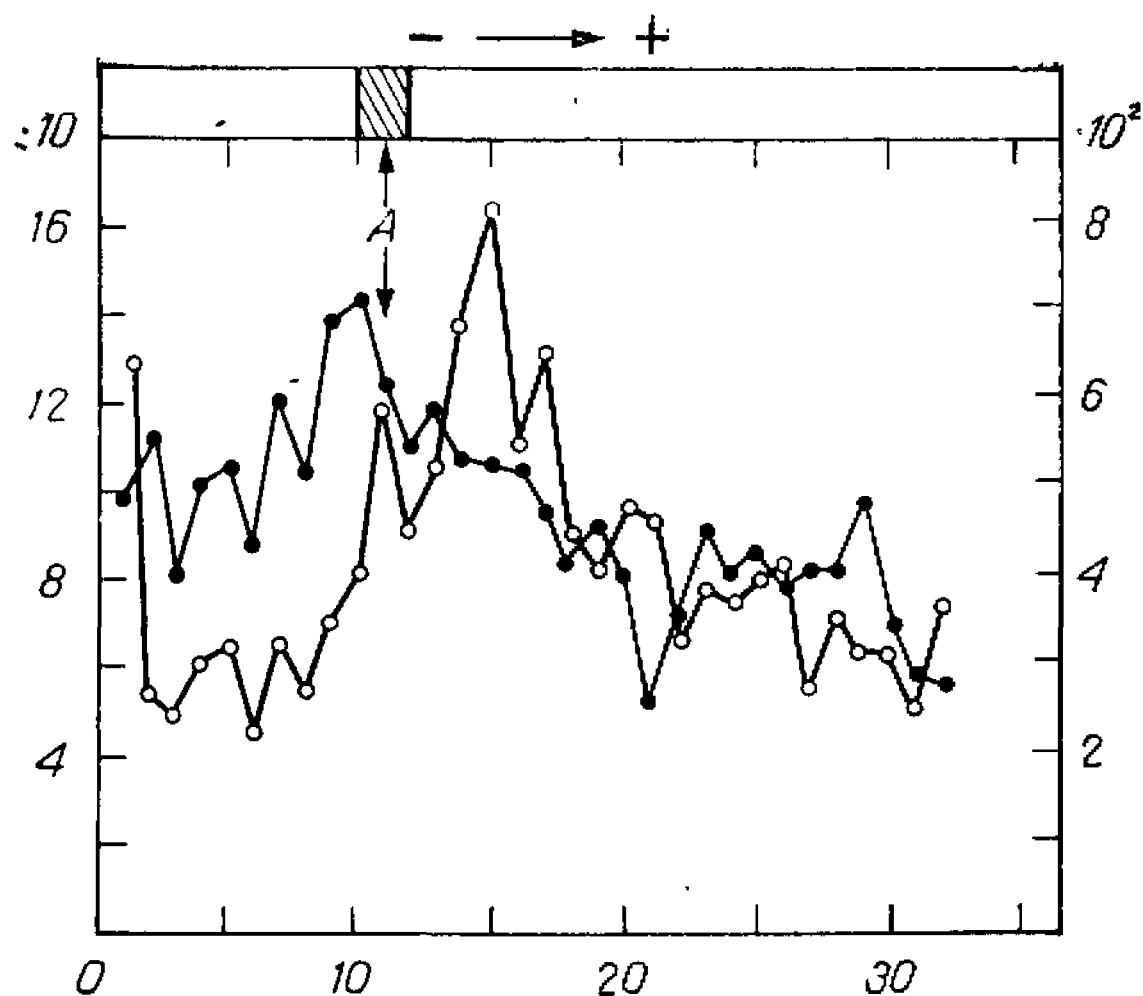


Рис. 32. Электрофорез в полиакриламидном геле растущих полипептидов из альбуминовых (белые кружки) и тотальных (темные кружки) полирибосом печени крысы.

На ординате — радиоактивность в имп/мин · 10 (тотальные полирибосомы), в имп/мин · 10² (альбуминовые полирибосомы); на абсциссе — фракции, извлеченные из полиакриламидного геля, по номерам.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ПОЛИРИБОСОМ, СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ С МЕМБРАНАМИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СЕТИ

А. Е. БЕРМАН

У высших организмов внутриклеточные белки синтезируются на полирибосомах, не образующих каких-либо комплексов с другими внутриклеточными структурами (свободные полирибосомы), а секретируемые белки — на полирибосомах, связанных с мембранами цитоплазматической сети (связанные полирибосомы). Детальное исследование функциональных и структурных особенностей свободных и связанных полирибосом возможно только при использовании методов, позволяющих получать эти субклеточные структуры в виде отдельных фракций. Ниже описан метод выделения в препаративных количест-

вах свободных и связанных полирибосом, разработанный для печени крыс (Blobel, Potter, 1967) и с успехом применяемый при исследовании других тканей (мозг, мышцы, куриные эмбрионы и др.).

РАСТВОРЫ

Для приготовления растворов используют бидистиллированную воду и реактивы высокой степени чистоты, квалификации о.с.ч. или х.ч.; менее чистые реактивы перекристаллизовывают. Буферные растворы готовят за 1—2 дня до начала опыта; все растворы хранят при 2—4 °С.

1 М трис-НСl (рН 7,6); 2,5 М раствор КСl; 0,5 М раствор ацетата или хлорида магния; сахара. Из этих растворов готовят четыре буферных раствора:

буфер А — 0,25 М сахара, 0,1 М КСl, 5 мМ соль магния, 25 мМ трис-НСl (рН 7,6);

буфер В — 1,5 М сахара, остальные компоненты те же, что в буфере А;

буфер В — 2 М сахара, остальные компоненты те же, что в буфере А;

буфер Г содержит те же компоненты, что и буфер А, но без сахара.

Все препаративные работы проводят при 2—4 °С (в том числе используют центрифуги с охлаждением).

ВЫДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ ПОЛИРИБОСОМ

50—60 г ткани гомогенизируют порциями по 5—7 г в 2,5 объемах (г/мл) буфера А в стеклянном цилиндрическом гомогенизаторе с тефлоновым пестиком, который вращается электромотором со скоростью 1500 об/мин. Гомогенат фильтруют через два слоя марли и фильтрат центрифугируют при 12 000 g в течение 15 мин; при этом осаждаются ядра и митохондрии. Постмитохондриальную надосадочную жидкость отсасывают, а осадок суспендируют в 3 объемах буфера А и центрифугируют при тех же условиях. Надосадочные жидкости от первого и второго центрифугирования объединяют. В пробирках объемом 12 мл от углового ротора Т-50 центрифуги «Спинко» L-2 создают ступенчатый градиент плотности сахара. Для этого в пробирки наливают по 4 мл буфе-

ра В и на него наслаивают по 3 мл буфера Б. Далее наслаивают по 5 мл постмитохондриальной надосадочной жидкости. Пробирки с созданным в них градиентом центрифугируют 20 ч при 42 000 об/мин. Можно использовать любой другой ротор, дающий ускорение выше 100 000 g, при этом следует соблюдать указанные выше соотношения между объемами буферов Б, В и постмитохондриальной жидкости.

При длительном центрифугировании свободные полирибосомы, плотность которых выше плотности буфера В, осаждаются на дно пробирок, а связанные с мембранами полирибосомы, плотность которых ниже плотности этого буфера, собираются над ним в виде окрашенных сгустков. Мембраны, не связанные с полирибосомами (незернистая сеть или гладкий ретикулум), задерживаются в буфере Б. После центрифугирования связанные полирибосомы отсасывают пипеткой с широким концом (удобно отсасывать пипеткой, соединенной резиновой трубкой со шприцем), затем отсасывают и отбрасывают все слои над осадком. Осадки, содержащие свободные полирибосомы, споласкивают буфером Г и суспендируют в 3—4 мл этого буфера с помощью маленького гомогенизатора. К связанным полирибосомам добавляют равный объем буфера Г, смесь суспендируют в гомогенизаторе и центрифугируют при 105 000 g в течение 1 ч. Осадки, содержащие связанные полирибосомы, суспендируют в 3—4 мл буфера Г. Из суспензий свободных и связанных полирибосом берут по 0,1—0,2 мл для определения содержания белка или РНК. Остальную часть можно использовать в качестве источника белоксинтезирующих структур в бесклеточной системе белкового синтеза (принципы составления такой системы и расчет ее компонентов изложены ниже; А. Е. Берман, см. с. 353).

Часто бывает необходимо выделить «связанные» полирибосомы после их освобождения от связи с мембранами. Отделение полирибосом от мембран достигают с помощью обработки детергентами: ионным (дезоксихолат натрия), неионным (трисон Х-100) или их смесью. Освобожденные от мембран полирибосомы, подобно свободным полирибосомам, осаждаются при центрифугировании через слой 2 М раствора сахарозы. К 8 мл суспензии связанных полирибосом добавляют 0,8 мл раствора, содержащего 13% дезоксихолата натрия и 10% трисон Х-100 (раствор готовят перед употреблением). Через

15 мин смесь наслаивают на 3 мл буфера В в пробирке ротора Т-50 и центрифугируют при 115 000 g (42 000 об/мин) в течение 4 ч. Осадок споласкивают буфером Г и суспендируют в 3—4 мл этого буфера.

Из 50—60 г ткани можно выделить 100—120 мг очищенных полирибосом (свободные+связанные). Соотношение выхода свободных и связанных с мембранами цитоплазматической сети полирибосом зависит от объекта. Из печени крыс, например, выделяют приблизительно равные количества свободных и связанных полирибосом (Erken, 1973). Суспензии полирибосом могут храниться при -20°C до 2 дней без потери белоксинтезирующей активности в бесклеточной системе.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ РИБОСОМНЫХ СУБЪЕДИНИЦ ИЗ РИБОСОМ 80 S-КЛАССА

О. Ю. АБАКУМОВА

Функционально активные рибосомные субъединицы используются для решения ряда задач, таких, как разборка и реконструкция рибосомных частиц, выяснение строения и функции отдельных рибосомных белков, анализ механизма различных стадий синтеза белка и т. д. В цитоплазме клеток млекопитающих 40 S — 60 S-пары рибосомных субъединиц образуют транслирующие рибосомы 80 S-класса, входящие в состав полирибосом, и одиночные нетранслирующие рибосомы. Кроме того, 40 S- и 60 S-субъединицы существуют изолированно друг от друга в форме так называемых нативных рибосомных субъединиц. Обычно обе частицы присутствуют в клетке в эквимолярных количествах. Они определенным образом распределены между фондами полирибосом и одиночных рибосом, но значительная их часть представлена нативными рибосомными субъединицами.

Связь между субъединицами в транслирующих рибосомах 80 S-класса очень прочна. Для того чтобы вызвать их диссоциацию, необходимо разрушить связь рибосом с мРНК и пептидил-тРНК. Один из способов диссоциации транслирующих рибосом 80 S-класса состоит в полном удалении Mg^{2+} из среды, но для значительной степени диссоциации в этом случае необходима высокая концентрация K^{+} или воздействие сильных хелирующих

агентов, таких как ЭДТА. Однако диссоциация в таких условиях сопровождается либо необратимыми структурными изменениями рибосомных субъединиц, либо изменением структуры рибосомных белков. Такие субъединицы обычно теряют способность к синтезу белка в бесклеточной системе, и их не удастся реассоциировать в полноценную рибосому.

Одиночные нетранслирующие рибосомы менее стабильны и легко диссоциируют либо при снижении концентрации Mg^{2+} , либо при относительном увеличении концентрации K^+ (Д. Файс и др., 1970; Martin, 1973). Образующиеся при этом производные — 40 S- и 60 S-субъединицы — способны к синтезу полипептидов в бесклеточной системе (Д. Файс и др., 1970). В обычных условиях содержание одиночных рибосом в нормальных животных клетках, например клетках печени, невелико (около 10%). Следовательно, чтобы получить биологически активные субъединицы в достаточном количестве, необходимо превратить транслирующие рибосомы в нетранслирующие.

Переход транслирующих рибосом в нетранслирующие с последующей их диссоциацией на биологически активные субъединицы может быть осуществлен обработкой препарата полирибосом пуромицином в растворе с высокой ионной силой. При образовании пептидной связи между пуромицином и растущим пептидом образуется пептидил-пуромицин. Последний не удерживается рибосомой и освобождается из нее в среду, трансляция останавливается, а образовавшаяся нетранслирующая рибосома диссоциирует в растворе с высокой ионной силой (Villa-Trevino e. a., 1964)*. Однако и здесь применение высоких концентраций KCl (до 0,88 M) может вызвать потерю белка малой субъединицей и изменить ее функциональные свойства (Wettenhall e. a., 1973). Этот метод используют для накопления нетранслирующих рибосом, но он требует больших количеств дорогостоящего пуромицина.

Нетранслирующие рибосомы можно получить также при инкубации очищенных полирибосом в бесклеточной системе белкового синтеза. В этих условиях все работающие рибосомы завершают начатые полипептидные цепи, освобождаются от них после окончания трансляции, и накапливаются в цитоплазме в виде одиночных рибосом, не содержащих мРНК (Falvey, Staehelin, 1970). Такие

монорибосомы несложно диссоциировать на субъединицы обработкой растворами с высокой ионной силой, например 0,5 М раствором KCl. Этот метод требует значительных затрат дорогостоящих реактивов (всех компонентов бесклеточной системы) и поэтому мало пригоден для препаративных целей.

Вышеописанные способы накопления нетранслирующих рибосом относятся к так называемым способам *in vitro*, когда воздействие производят на выделенные из клеток чистые препараты полирибосом. Резкое увеличение количества одиночных рибосом можно получить и непосредственно в клетке, если применить вещества, ингибирующие инициацию трансляции, например фторид натрия или этионин — структурный аналог метионина.

При действии этионина на клетки печени происходит перераспределение рибосомных частиц между фондами полирибосом и одиночных рибосом таким образом, что основная масса рибосом (~70%) оказывается в форме одиночных рибосом, не связанных с мРНК и пептидил-тРНК (в дальнейшем мы будем называть их «этиониновыми рибосомами», или ЭТРс). Такое накопление одиночных рибосом связано с тем, что при действии этионина резко замедляется присоединение рибосом к инициаторному участку мРНК. После удаления ингибитора ЭТРс быстро вовлекаются в трансляцию и в клетках восстанавливается нормальный синтез белка, что указывает на отсутствие повреждения рибосом. Действительно, полученные из ЭТРс субъединицы сохраняют способность вновь ассоциировать в исходные рибосомы, способность к синтезу полифенилаланина в условиях бесклеточной системы (О. Ю. Абакумова и др., 1973)* и структурную целостность (Н. А. Киселев и др., 1973)*.

Ниже описан метод получения рибосомных субъединиц из ЭТРс, который дает возможность получать препаративные количества биологически активных 40 S- и 60 S-субъединиц из клеток печени различных животных.

ПОЛУЧЕНИЕ РИБОСОМНОГО МАТЕРИАЛА

Растворы

Раствор I: 0,25 М сахара, 0,005 М $MgCl_2$, 0,05 М KCl, 0,025 М трис-HCl буфер (pH 7,6).

Раствор II: 0,001 М $MgCl_2$, 0,01 М фосфатный буфер (pH 7,6).

Раствор III: 0,005 М MgCl_2 , 0,01 М фосфатный буфер (рН 7,6).

Раствор этионина в 0,85% растворе NaCl, содержащий 200 мг этионина в 6 мл раствора.

Растворы I—III готовят на деионизированной воде, рН доводят до 7,6 при комнатной температуре.

Выделение препарата ЭТРС

При получении препарата ЭТРС из печени крыс желательно использовать самок, так как у них по сравнению с самцами после введения этионина более выражено подавление синтеза белка в печени (Schlunk e. a., 1968). Раствор этионина из расчета 1 мг/г массы тела животного готовят непосредственно перед употреблением. Ввиду плохой растворимости этионина при комнатной температуре его растворяют при 100°C и затем вводят животным внутрибрюшинно раствор, имеющий температуру примерно 60°C. Животных оставляют на ночь и дают им только воду. Через 16—17 ч после введения этионина крыс забивают декапитацией, печень немедленно извлекают, взвешивают и тщательно промывают ледяной водой и затем ледяным раствором I. Все последующие процедуры проводят в холодной комнате при 3—4°C. Preparative получение ЭТРС осуществляют в центрифуге ЦВР-1 при 2—3°C. Для получения рибосомного материала используют методику В. Л. Лейтина и М. И. Лермана (1969). Выход ЭТРС на 1 г печени составляет от 4 до 6 мг.

Полученный препарат ЭТРС диализуют в течение ночи против раствора II, нерастворившийся при диализе материал отделяют центрифугированием при 4—5000 g в течение 10 мин при 3—4°C. В надосадочной жидкости определяют концентрацию ЭТРС и чистоту полученного препарата. Для качественной и количественной характеристики компонентов препарата ЭТРС проводят седиментационный анализ при 138 800 g (в роторе AN-D центрифуги «Спинко-Е» при 43 700 об/мин, угол 60°) и в линейном градиенте концентрации сахарозы. Можно использовать градиент концентрации сахарозы 10—50%. Раствор сахарозы готовят на растворе II. Центрифугируют в течение 8 ч при 65 000 g (23 000 об/мин в бакет-роторе SW 25.2 центрифуги «Спинко» L2.50) при 10°C. Коэффициенты седиментации рассчитывают по Маркхэму (В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1969).

УСЛОВИЯ ДИССОЦИАЦИИ ЭТРС

ЭТРС диссоциируют инкубацией их в растворе III, содержащем 0,5 М КСl, в течение 30 мин при 37 °С. В этом растворе отношение молярных концентраций K^+/Mg^{2+} составляет 100. Это оптимальные условия для сохранения структурной целостности образующихся при диссоциации ЭТРС 40 S- и 60 S-субъединиц. Уже при отношении K^+/Mg^{2+} , равном 500, от исходных частиц отделяется заметное количество материала (вероятно, белка), седиментирующего в зоне мениска при анализе со шлирен-оптикой (О. Ю. Абакумова и др., 1973).

УСЛОВИЯ РАЗДЕЛЕНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ 40 S- и 60 S-ЧАСТИЦ

Продукты диссоциации ЭТРС наслаивают на линейный градиент концентрации сахарозы 10—50%. Раствор сахарозы готовят на растворе II с добавлением 0,5 М КСl. Отношение молярных концентраций K^+/Mg^{2+} в этом растворе равно 500, что лучше для количественного разделения субъединиц. В одной пробирке бакет-ротора SW25.2 (объем 50 мл) допустимо разделение 40 мг исходного материала ЭТРС. Центрифугирование проводят в течение 12—13 ч при 50 000 g (20 000 об/мин) и 10 °С. Соотношение масс 60 S- и 40 S-частиц в данных условиях диссоциации и центрифугирования составляет 2,7 : 1, что равно теоретическому соотношению.

Полученные в результате фракционирования в градиенте плотности сахарозы растворы частиц можно концентрировать несколькими способами:

1. Фракции, извлеченные из пробирок с градиентом в зонах соответствующих пиков, содержащие 40 S- и 60 S-частицы соответственно, объединяют, охлаждают льдом и к раствору добавляют 3 объема охлажденного этанола, концентрацию $MgCl_2$ в растворе доводят до 8 мМ, тщательно перемешивают и помещают в морозильник холодильника на 30 мин. Осадок субъединиц отделяют центрифугированием при 4—5000 g и суспендируют в растворе, необходимом для дальнейшего анализа.

2. Субъединицы из фракций градиента осаждают при применении углового ротора Ti-50 «Спинко» L2.50 в течение 3 ч при 150 000 g и 3 °С. Осадки суспендируют в растворе III и отделяют центрифугированием при 10 000 g от нерастворившегося материала.

3. Раствор субъединиц из пробирок с градиентом наносят на колонку с сефадексом G-75 (диаметр колонки 1 см, высота столба сефадекса 10 см), уравновешенным раствором III. Элюируют раствором III, собирают фракции по 1 мл. Основная масса материала выходит в первых двух фракциях.

Если ЭТРС и их субъединицы не предполагают использовать немедленно, то к их раствору добавляют сахарозу до конечной концентрации 5%, замораживают в жидком азоте и хранят при -20°C .

УСЛОВИЯ РЕАССОЦИАЦИИ СУБЪЕДИНИЦ ЭТРС

Материал из растворов, содержащих 60 S- и 40 S-частицы, объединяют в отношении 2,5:1 и диализуют в течение ночи против раствора II. Затем к нему добавляют раствор MgCl_2 до конечной концентрации 0,07 М и центрифугируют при 35 000 g в течение 40 мин. Осадок суспендируют в ледяной воде и диализуют 2 ч против раствора II. В указанных условиях субъединицы ЭТРС почти полностью ассоциируют в исходные 75 S рибосомы. Для определения биологической активности исходных и реассоциированных ЭТРС и их субъединиц анализируют способность частиц синтезировать полифенилаланин в условиях бесклеточной системы белкового синтеза (О. Ю. Абакумова и др., 1973)*.

Седиментационный анализ субъединиц в растворах сахарозы с отношением молярных концентраций K^+ и Mg^{2+} , равным 10—20, позволяет судить об однородности препарата субъединиц. 40 S-субъединицы после первого разделения в градиенте плотности сахарозы получают в чистом виде, между тем как 60 S-частицы содержат 80 S-компонент, и для получения их в чистом виде необходима дополнительная процедура очистки путем центрифугирования материала 60 S-частиц в градиенте плотности сахарозы в растворе с отношением $\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$, равным 10—20. Выход 40 S-частиц составляет около 30% всего рибосомного материала, взятого для разделения, и в одном опыте при использовании ротора SW25.2 можно получить 25—30 мг 40 S-субъединиц.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ РИБОСОМ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

М. П. ЯВИЧ

Для получения рибосом из скелетной и сердечной мышцы обычно используют водно-солевые среды, предназначенные для выделения рибосом печени (Earl, Korneg, 1965; Breuer, Florini, 1965; Zak e. a., 1967). Характерная особенность этих методов — низкая ионная сила применяемых растворов. Рибосомы мышц, полученные таким путем, оказываются недостаточно очищенными от постороннего белка. Так, для рибосом скелетной мышцы отношение поглощения при $A_{260/236}$ составляет 1,4; для рибосом сердца — 1,22, что ниже соответствующих величин для очищенных рибосом. Вторым недостатком названных методов заключается в том, что при гомогенизации тканей мышц в буферном растворе с низкой ионной силой основная масса рибосом при низкоскоростном центрифугировании гомогената осаждается вместе с ядрами, миофибриллами и митохондриями, а рибосомы, сохраняющиеся в постмитохондриальном экстракте, составляют всего 10—15% РНК клетки и, по всей вероятности, не отражают всего разнообразия рибосомных структур мышц.

Известно, что основная масса рибосом сердца связана с миофибриллами, причем, согласно данным электронной микроскопии, рибосомы располагаются в саркомерах и именно на этих рибосомах осуществляется синтез белков актомиозинового комплекса. Для перевода миофибрилл в раствор требуется буфер с высокой ионной силой. В этих условиях миофибриллы и связанные с ними рибосомы не осаждаются вместе с ядрами и митохондриями, а остаются в постмитохондриальном экстракте.

Буфер с высокой ионной силой (η 0,3) был применен Хейвудом и Ричем для получения рибосом из сердечной и скелетной мускулатуры эмбриона цыпленка (Heuwood e. a., 1968). Используя этот метод с некоторыми модификациями, можно выделить из сердечной мышцы взрослых крыс относительно большие количества рибосом, причем половину их количества составляют полирибосомы.

Ниже изложены методы получения и анализа рибосом сердечной мышцы взрослых крыс.

РЕАКТИВЫ

Буфер I — 250 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-HCl (pH 7,6).

Буфер II — 10 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-HCl (pH 7,6).

20% раствор тритона X-100 готовят непосредственно перед употреблением.

10% и 40% растворы сахарозы. Для приготовления сахарозного градиента плотности в объеме 50 мл берут два исходных раствора (для смесителя) — 23,4 мл 40% раствора сахарозы и 26,6 мл 10% раствора сахарозы.

0,5 М раствор ЭДТА (pH 7,4).

Все вышеуказанные растворы готовят на деионизированной воде.

10% и 5% растворы трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

¹⁴C-оротовая кислота; растворяют в горячей воде, добавляя небольшие количества Na₂CO₃ до pH 7,4.

Раствор РНК (фирма «Reanal», Венгрия) готовят из расчета 1 мг/мл, нейтрализуя раствором Na₂CO₃ или NaOH.

Бычья рибонуклеаза (фирма «Merk», ФРГ), готовят из расчета 15 мкг/мл пробы.

Сцинтилляционная жидкость для измерения радиоактивности: 3,5 г ППО и 0,1 г ПОПОП растворяют в сцинтилляционном толуоле и доводят до 1 л.

ПОЛУЧЕНИЕ РИБОСОМНОГО МАТЕРИАЛА

Животных забивают декапитацией. Сердца быстро извлекают, отмывают от крови ледяной водой, просушивают фильтровальной бумагой и мелко нарезают ножницами. Кашицу помещают в 4-кратный объем охлажденного буфера I и добавляют в эту среду 20% раствор тритона X-100 до конечной концентрации 0,5%. Ткани сначала измельчают в гомогенизаторе типа Уоринга (30 с, 8000 об/мин), а затем в стеклянном гомогенизаторе типа Поттера с тефлоновым пестиком. При этом сначала применяют гомогенизатор со слабо притертым пестиком (5—6 ходов), а затем с более плотно притертым (также 5—6 ходов). Гомогенизатор помещают в стакан со льдом и всю процедуру проводят в холодной комнате при температуре 4°C.

Гомогенат сердечной мышцы быстро фильтруют через двойной слой марли и центрифугируют 15 мин при 12 000 g для удаления неразрушенных клеток, ядер и

митохондрий. Цитоплазматический экстракт сердечной мышцы, освобожденный от ядер и митохондрий, разводят в 4 раза буфером II и оставляют стоять 15 мин в ледяной бане. В результате снижения ионной силы разведенного постмитохондриального экстракта в процессе последующего центрифугирования (12 000—15 000 g, 15 мин) рибосомы седиментируют в осадок. Осадок осторожно суспендируют в малом объеме буфера I. Препаративное получение рибосом проводят в центрифуге ЦВР-1 при температуре 2—3 °C.

Количество РНК в гомогенате сердечной мышцы, постмитохондриальном экстракте и рибосомных препаратах определяют по методу Спирина (А. С. Спирин, 1958). Содержание РНК в постмитохондриальном экстракте сердца составляет около 57 % всей РНК гомогената, что дает в препарате рибосом около 0,5 мг РНК на 1 г сырой массы ткани. Такой выход рибосом примерно в 4 раза превосходит выход препаратов рибосом, получаемых при гомогенизации тканей сердца в буфере с низкой ионной силой.

АНАЛИЗ РИБОСОМ

Препараты рибосом, получаемые при использовании буфера с высокой концентрацией калия, загрязнены белком, по-видимому, миозином. Отношение поглощения для них при $A_{260/250}$ составляет 1,45—1,5. Наличие дополнительного белка обнаруживается также при седиментационном анализе постмитохондриального экстракта в градиенте концентрации сахарозы. Учитывая это обстоятельство, для исследования рибосомных структур сердца целесообразно применять их седиментационный анализ в сочетании с меткой по РНК.

Крысам водят ^{14}C -оротовую кислоту из расчета 100 мкКи на животное. Время экспозиции составляет 48 ч. За этот период изотоп концентрируется в рибосомной (рРНК) и транспортной (тРНК) РНК. При седиментационном анализе тРНК локализуется в верхних фракциях сахарозного градиента. Следовательно, основная часть фракций градиента концентрации сахарозы представлена рибосомами.

Седиментационный анализ проводят следующим образом. 4 мл постмитохондриального экстракта сердечной мышцы, приготовленного на буфере I, наслаивают на

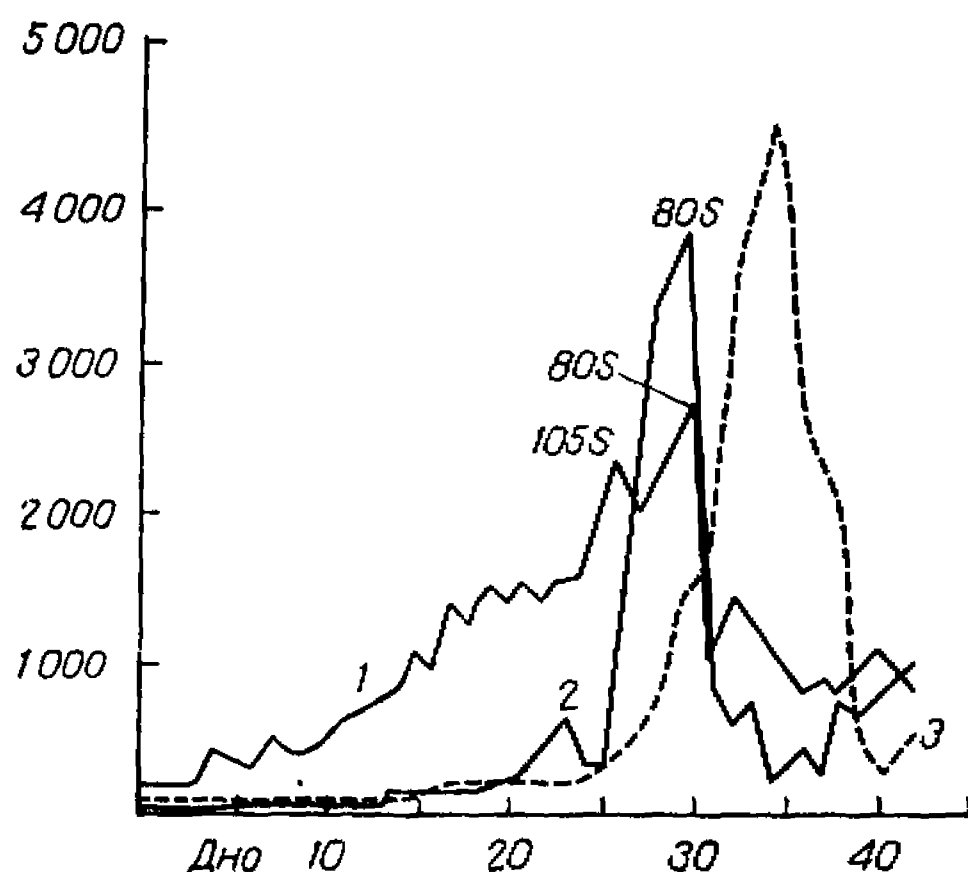


Рис. 33. Седиментационный профиль рибосом сердечной мышцы крыс. 1 — контроль, 2 — обработка постмитохондриального экстракта РНК-азой, 3 — обработка постмитохондриального экстракта ЭДТА. На ординате — радиоактивность в имп/мин на фракцию; на абсциссе — фракции градиента плотности сахарозы по номерам, начиная от дна пробирки.

линейный градиент сахарозы (10—40% концентрации сахарозы, приготовленной на буфере I) и центрифугируют в течение 2 ч при 64 000 g (23 000 об/мин в бакет-роторе SW25 центрифуги «Спинко») при 4 °C.

По окончании центрифугирования пробирки прокалывают в дне и собирают по 45 капель в каждую фракцию. Для определения радиоактивности отдельных фракций рибосом к каждой пробе добавляют в качестве носителя 0,2 мг дрожжевой РНК и 10% раствор ТХУ до конечной концентрации 5%. Осадки наносят на миллипоровые фильтры «Aufs», промывают холодным 5% раствором ТХУ, спиртом и высушивают. Радиоактивность осадков измеряют в сцинтилляционном счетчике.

Седиментационный профиль рибосом сердечной мышцы показан на рис. 33 (кривая 1). Согласно распределению радиоактивности, он имеет характерную форму с острым пиком в области мономера (80 S) и димера (105 S).

Определение количества полирибосом в тотальных препаратах рибосом сердца проводят путем подсчета суммарной радиоактивности фракций градиента, содержащих транслирующий материал и нетранслирующие рибосомы — димеры, мономеры и субъединицы. Локали-

зацию субъединиц рассчитывают главным образом исходя из расположения мономерного пика, так как верхние фракции градиента, начиная с 36-й пробы, имеют красную окраску, обусловленную наличием гемопротеидов.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА НАЛИЧИЯ ПОЛИРИБОСОМ ПО СЕДИМЕНТАЦИОННОМУ ПРОФИЛЮ РИБОСОМ СЕРДЦА

Наличие полирибосом в рибосомной популяции сердечной мышцы можно доказать обработкой постмитохондриального экстракта сердца РНК-азой или раствором ЭДТА. В первом случае цитоплазматический экстракт сердечной мышцы перед наслаиванием на сахарозный градиент в течение 15 мин инкубируют с бычьей РНК-азой из расчета 15 мкг/мл экстракта. Во втором случае к постмитохондриальной фракции сердечной мышцы добавляют 0,5 М раствор ЭДТА до конечной концентрации 0,02 М. В этом опыте сахарозные градиенты готовят на буфере, содержащем только 0,250 М KCl и 10 mM трис-HCl (pH 7,4).

Мягкая обработка полирибосом малыми дозами РНК-азы приводит к распаду мРНК и фрагментации полирибосом на мономеры. Добавление ЭДТА удаляет Mg^{2+} из раствора и частиц и вызывает диссоциацию рибосом на субъединицы. Эти эффекты РНК-азы и ЭДТА можно наблюдать в градиенте плотности сахарозы на седиментационном профиле рибосом (см. рис. 33).

Таким образом, пользуясь методом Хейвуда и соавторов, из сердечной мышцы взрослых крыс можно выделить относительно большие количества рибосом, причем около 50% их составляют полирибосомы. Рибосомы сердечной мышцы, извлекаемые буфером с высокой ионной силой, очевидно, являются представителями основной или всей популяции рибосомных структур сердца.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РНК И ДНК В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

М. Г. ТРУДОЛЮБОВА

При получении различных субклеточных фракций клеток животных (ядер, митохондрий, микросом, полирибосом и т. д.) необходим строгий контроль за чистотой

и гомогенностью получаемых фракций. Одна из главных причин загрязнения цитоплазматических фракций ядерным материалом (следовательно, ДНК)— плохое качество гомогенизации, ведущее к разрушению ядер. Поэтому для оценки чистоты цитоплазматических фракций необходимо количественное определение в них ДНК. Для полной характеристики фракций на чистоту и гомогенность определяют соотношения РНК/белок и РНК/ДНК. Содержание белка обычно определяют методом Лоури. Ниже изложен наиболее приемлемый и достаточно точный метод определения РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных.

В основе метода определения РНК лежит фракционирование по Шмидту и Тангаузеру с последующей спектрофотометрией (Schmidt, Thannhauser, 1945), которое сводится к последовательному удалению кислоторастворимой фракции, липидов и выявлению и определению с помощью щелочного и кислотного гидролизом нуклеиновых кислот и белка. В своем классическом варианте этот метод исключительно трудоемкий. Fleck, Munro (1962), проанализировав детально этот метод, пришли к заключению, что на количественное определение РНК сильно влияет продолжительность щелочного гидролиза (1 М раствор КОН). Поэтому авторы рекомендовали сократить время щелочного гидролиза до 1 ч и снизить концентрацию щелочи до 0,3 М. Кроме того, ими было показано, что присутствие липидов в образце не оказывает влияния на точность определения РНК. Между тем предварительное извлечение липидов приводит к значительным потерям РНК в исследуемом материале (О. Ю. Абакумова, см. с. 338). Для определения РНК в гомогенатах и окрашенных субклеточных фракциях животных клеток целесообразно пользоваться методом Блобеля и Поттера (Blobel, Potter, 1968), которые учли все замечания Fleck и Munro и внесли ряд собственных улучшений.

Реактивы: 0,3 М, 0,5 М и 0,6 М растворы HClO_4 .

0,6 М раствор КОН.

Ход определения. Определение проводят строго на холоду в центрифужных пробирках, ставя 4—5 параллельных проб.

К 0,1 мл образца прибавляют 1,9 мл 0,3 М раствора HClO_4 . Для полноты осаждения кислотонерастворимой фракции пробирки на 15 мин помещают в лед. Затем

центрифугируют при 2000—3000 g 10—15 мин. Осадки дважды отмывают 0,2 М раствором HClO_4 . После последнего центрифугирования стенки пробирки тщательно подсушивают марлей или фильтровальной бумагой, чтобы избежать загрязнения осажденной фракции кислоторастворимым материалом, имеющимся в надосадочной жидкости.

Осадки суспендируют, предварительно растерев стеклянной палочкой в 0,5 мл воды, затем добавляют при комнатной температуре 0,5 мл 0,6 М раствора KOH , суспензия при этом светлеет. Если осадок суспендировать непосредственно в 0,3 М растворе KOH , быстро образуется желатиноподобный осадок, который не растворяется даже после гидролиза в течение 1 ч при 37 °С. Через 1 ч инкубации при 37 °С пробирки переносят в лед для остановки гидролиза.

В каждую пробирку добавляют по 2 мл 0,6 М раствора HClO_4 и оставляют на 15 мин во льду. Центрифугируют 10 мин при 2—3000 g. Надосадочную жидкость параллельных проб объединяют и для определения содержания РНК измеряют поглощение в ультрафиолетовом свете при 260 нм. Стенки пробирок тщательно подсушивают, так как в осадке в дальнейшем определяют ДНК.

Для перевода величины оптической плотности при 260 нм в миллиграммы РНК используют значение $E_{1\%}^{1\text{см}, 260} = 312$.

Для определения РНК во фракциях рибосом (обычно неокрашенных) можно пользоваться упрощенным методом (А. С. Спирин, 1958). 0,1 мл фракции рибосом (3—4 параллельные пробы) вносят в 3 мл 0,5 М раствора HClO_4 , помещенные в стеклянную пробирку с каплеуловителем. Гидролиз проводят в течение 20 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения и центрифугирования в надосадочной жидкости измеряют на спектрофотометре оптическую плотность при 270 нм (D_{270}) и 290 нм (D_{290}) против контрольной пробы, содержащей 0,1 мл воды (вместо фракции рибосом) в 0,5 М HClO_4 . Для расчета используют формулу (вывод см. А. С. Спирин, 1958):

Количество РНК в мкг на 1 мл надосадочной жидкости =

$$= \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19} \cdot 10,5.$$

Именно этим методом рекомендуется определять содержание ДНК в осадках, оставшихся после щелочного гидролиза при определении РНК (см. с. 315). Подсушенные пробирки с осадками заливают 0,5 М раствором HClO_4 по 3—5 мл на пробу (объем пробы точно фиксируют). Гидролиз проводят с каплеуловителя (во избежание изменения объема) на кипящей водяной бане в течение 20 мин. Для расчета используют следующую формулу:

$$\begin{aligned} \text{Количество ДНК в мкг на 1 мл надосадочной жидкости} = \\ = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19} \cdot 10,1. \end{aligned}$$

Все определения, проведенные описанными методами, дают результаты, хорошо совпадающие с литературными данными.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ СОДЕРЖАЩЕЙ ПОЛИ(А) мРНК ИЗ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Е. В. ЛЮБИМОВА, О. В. ПОДОБЕД

Наличие в мРНК последовательностей поли(А), ковалентно связанных с 3'-концом, позволило разработать метод выделения содержащей поли(А) мРНК. Метод основан на способности поли(А)-сегментов мРНК образовывать в среде с высокой ионной силой комплексы с поли(У)- или поли(дТ)-полимерами, иммобилизованными на целлюлозе, сефарозе или фильтрах из стеклянного волокна.

Содержащую поли(А) мРНК можно выделить, имея в качестве исходного препарата: а) суммарную РНК полирибосом; б) полирибосомы, предварительно обработанные ЭДТА и додецилсульфатом натрия (ДДС-Na).

РЕАКТИВЫ И РАСТВОРЫ

Фенол. Кристаллический фенол перед использованием перегоняют, согласно методике Дрэпера и Полларда (Draper, Pollard, 1949), и хранят при 5—6 °С. Непосредственно перед выделением РНК фенол насыщают буфе-

ром для экстракции и смешивают с хлороформом в отношении 1 : 1.

Хлороформ очищают от примесей спирта, имеющих в продажном препарате, встряхиванием с водой и перегонкой (собирают фракцию при 61,2 °С).

96% этанол, перегнанный. Абсолютный этанол.

Целлюлоза, микрокристаллическая для тонкослойной хроматографии (фирмы «Chetapol», Чехословакия).

Калиевая соль полиуридиловой кислоты (фирма «Calbiochem», США).

Калиевая соль полиадениловой кислоты (фирма «Reanal», Венгрия).

0,5 М раствор ЭДТА (рН 7,5).

20% раствор додецилсульфата натрия.

0,01 М трис-НСl буфер (рН 7,6), содержащий 0,1 М NaCl (для экстракции и нанесения образца на колонку).

0,01 М трис-НСl буфер (рН 7,6), содержащий 0,01% поливинилсульфата (для растворения РНК).

0,01 М трис-НСl буфер (рН 7,6), содержащий 0,01 М ЭДТА; 0,25% ДДС-Na, 90% формамид (для элюции мРНК с колонки).

0,01 М трис-НСl буфер (рН 9,0).

1 М раствор HCl; 1 М и 3 М растворы NaCl.

ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ ПОЛИРИБОСОМНОЙ РНК

Установлено, что при выделении РНК обычным фенольно-детергентным способом при комнатной температуре и значении рН, близком к нейтральному, часть мРНК, содержащей поли(А), теряется, переходя в фенольную или промежуточную фазу, а также происходит отщепление поли(А) от молекулы мРНК (Реггу е. а., 1972). Чтобы избежать потери содержащей поли(А) мРНК, метод выделения РНК модифицируют. Экстракцию РНК проводят при 60 °С (Г. Л. Георгиев и В. Л. Мантьева, 1962) и рН 9,0 (Врауегман е. а., 1972), используя для депротенинизации смесь фенола и хлороформа в отношении 1 : 1 (Реггу е. а., 1972)* или обрабатывают полирибосомы перед депротенинизацией ЭДТА (Dagnell е. а., 1971).

Осадок полирибосом растворяют в буфере для экстракции в концентрации 2—3 мг/мл, переносят в колбу с притертой пробкой, добавляют 0,5 М раствор ЭДТА

до конечной концентрации 0,02 М и затем 20% раствор ДДС-На до конечной концентрации 0,5%. Смесь встряхивают вручную несколько секунд, затем приливают равный объем смеси фенола с хлороформом, насыщенный буфером для экстракции. Смесь интенсивно встряхивают в течение 20 мин в шюттель-аппарате при комнатной температуре. Фазы разделяют центрифугированием при температуре 3—5 °С при 2500—3000 g в течение 25 мин. Водный слой отсасывают при помощи шприца или пипетки и переносят в чистую колбу с притертой пробкой, а с фенольным и промежуточным слоями проводят повторную экстракцию, используя половинный объем буфера для экстракции, содержащего 0,5% ДДС-На. Водные слои, полученные при первой и второй экстракциях, объединяют и проводят еще три раза депротеинизацию, используя каждый раз равный объем свежей смеси фенола-хлороформа, насыщенной буфером для экстракции.

На этой стадии фракционирования после разделения фаз промежуточная фаза должна полностью отсутствовать. Если имеется сколько-нибудь заметная промежуточная фаза, то следует повторить депротеинизацию еще раз. После окончания депротеинизации к водному слою добавляют 3 М раствор NaCl до конечной концентрации 0,1 М и три объема 96% этанола, охлажденного до —20 °С, и оставляют на ночь при —20 °С. РНК собирают центрифугированием при 2500—3000 g 20 мин, растворяют в охлажденном буфере, содержащем 0,01 М трис-HCl (pH 7,6) и 0,01% поливинилсульфата (ингибитор РНК-азы). К раствору РНК добавляют 1 М раствор NaCl до конечной концентрации 0,1 М и 3 объема охлажденного 96% этанола. Переосаждение повторяют 3—4 раза. Концентрацию РНК и степень ее чистоты определяют измерением оптической плотности раствора РНК при 235, 260 и 280 нм. Для чистой РНК характерны соотношения:

$$\frac{A_{260}}{A_{235}} \geq 2,3 \text{ и } \frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 2,0.$$

При этом методе выделения выход полирибосомной мРНК печени по метке составляет 90—95%. Определение проведено в присутствии небольшой дозы актиномина D, т. е. в условиях, когда метилась исключительно мРНК.

ВЫДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАЩЕЙ ПОЛИ(А) мРНК ПОЛИРИБОСОМ МЕТОДОМ СОРБЦИИ НА ПОЛИ(У) -ЦЕЛЛЮЛОЗЕ

Получить препарат мРНК, свободный от примеси рРНК, фенольнодетергентным способом невозможно. Для этой цели необходимо использовать специфическую сорбцию мРНК на колонке с поли(У)- или поли(dT)-целлюлозой.

Приготовление поли(У)-целлюлозы

15 г целлюлозы помещают на стеклянный фильтр и последовательно промывают 200 мл 96% этанола, 100 мл 1 М раствора HCl, 500 мл дистиллированной воды и снова 100 мл 96% этанола. Промытую целлюлозу просушивают в термостате при 37 °С в течение 24 ч, затем добавляют 15 мл раствора поли(У) в деионизированной воде в концентрации 8 мг/мл из расчета 1 мл раствора поли(У) на 1 г целлюлозы. Полученную пасту хорошо перемешивают до равномерного увлажнения целлюлозы и лиофильно высушивают. Далее смесь целлюлозы и поли(У) помещают по 1 г в чашки Петри и каждую порцию тщательно суспендируют в 10 мл абсолютного этанола. Чашки Петри ставят на расстоянии 20 см под ультрафиолетовую лампу мощностью 45 Вт на 30 мин, перемешивая суспензию через каждые 10 мин. За этот период происходит процесс сшивки поли(У) с целлюлозой. Затем содержимое чашек объединяют, переносят на стеклянный фильтр и отмывают от несвязанной поли(У) 200 мл 0,5% раствора ДДС-Na и затем деионизированной водой до исчезновения следов поли(У) в промывных водах.

Обычно 1 г целлюлозы связывает 0,3—0,4 мг поли(У). Поли(У)-целлюлозу можно хранить под этанолом при —20 °С в течение месяца (Sheldon e. a., 1972).

Определение емкости поли(У)-целлюлозы

1 г поли(У)-целлюлозы, хранившейся под этанолом, вносят в термостатируемую колонку размером 0,9××15 см со стеклянным фильтром. Через сформированную и уравновешенную буфером для нанесения образца колонку с поли(У)-целлюлозой пропускают раствор поли(А) в концентрации 0,8 единицы оптической плотности

(опт. ед.) при 260 нм в том же буфере со скоростью 0,5 мл/мин. Насыщение поли(У)-целлюлозы раствором поли(А) продолжают до тех пор, пока оптическая плотность фильтрата станет равной оптической плотности наносимого раствора поли(А). Обычно для полного насыщения 1 г поли(У)-целлюлозы достаточно 20 мл указанного раствора поли(А).

Далее целлюлозу отмывают буфером для нанесения образца от несвязавшейся поли(А) и приступают к количественной элюции поли(А), связавшейся с поли(У)-целлюлозой. Для этого в колонке поднимают температуру до 25 °С и пропускают через нее 25 мл буфера для элюции РНК с колонки или такое же количество 0,01 М трис-НСl буфера (рН 9,0), собирая фракции по 5 мл. Измеряя A_{260} в каждой фракции элюата, вычисляют суммарное количество опт. ед. поли(А), связавшейся с поли(У)-целлюлозой. Определенное таким способом количество оптических единиц поли(А) является относительной характеристикой емкости 1 г данного препарата поли(У)-целлюлозы. Как правило, емкость 1 г приготовленной вышеописанным методом поли(У)-целлюлозы равна 5—6 опт. ед. Определение емкости необходимо проводить для каждого вновь приготовленного препарата поли(У)-целлюлозы.

Сорбция содержащей поли(А) мРНК на поли(У)-целлюлозе

Нанесение на поли(У)-целлюлозу суммарной РНК полирибосом

Осадок РНК растворяют в 0,01 М трис-НСl буфере (рН 7,6), содержащем 0,1 М NaCl, так, чтобы конечная концентрация РНК была 0,3—0,6 мг/мл, и наносят на колонку с поли(У)-целлюлозой при комнатной температуре со скоростью 0,5 мл/мин. 1 г поли(У)-целлюлозы достаточно для того, чтобы извлечь всю содержащую поли(А) мРНК из 10 мг суммарной РНК полирибосом.

Нанесение на поли(У)-целлюлозу полирибосом

Полирибосомы, полученные по методу Шрейера и Стахелина (Schreier, Staehelin, 1973), растворяют в 0,01 М трис-НСl буфере (рН 7,6) так, чтобы конечная

концентрация полирибосом была 1—2 мг/мл. К раствору полирибосом добавляют 0,5 М раствор ЭДТА (рН 7,5) до конечной концентрации 0,02 М, 20% раствор ДДС-Na до конечной концентрации 0,5% и смесь инкубируют 1 мин при 37 °С, затем добавляют 1 М раствор NaCl до конечной концентрации 0,1 М. Непосредственно перед нанесением на колонку с поли(У)-целлюлозой раствор полирибосом разбавляют вдвое 0,01 М трис-HCl буфером (рН 7,6), содержащим 0,1 М NaCl. Таким образом, на поли(У)-целлюлозу наносят раствор полирибосом в концентрации 0,5—1,0 мг/мл в 0,01 М трис-HCl буфере (рН 7,6), содержащем 0,1 М NaCl, 0,01 М ЭДТА, 0,25% ДДС-Na, со скоростью не более 0,5 мл/мин при комнатной температуре (Lindberg, Persson, 1972). Основная масса несвязавшегося с поли(У)-целлюлозой материала выходит с колонки в первых четырех фракциях (объем фракции 5 мл). Далее, независимо от того, наносят ли на поли(У)-целлюлозу суммарную РНК полирибосом или полирибосомы как таковые, колонку необходимо отмыть от несвязавшегося материала 20 мл буфера для нанесения. Отмывку контролирует спектрофотометрически.

Эволюция сорбированного материала [поли(А) мРНК]

Элюцию сорбированного материала — поли(А) мРНК — проводят буфером для элюции или 0,01 М трис-HCl буфером (рН 9,0) при температуре 25—30 °С со скоростью 0,5 мл/мин, собирая фракции по 5 мл. Содержащая поли(А) мРНК полностью элюируется с колонки в первых 20 мл буфера.

Содержащая поли(А) мРНК печени крысы, выделенная методом сорбции на поли(У)-целлюлозе, имеет характерное для мРНК распределение в градиенте плотности сахарозы: основная масса материала седиментирует в области от 30 S до 10 S. Нуклеотидный состав характеризуется высоким содержанием АМФ (30%) и имеет отношение $\frac{\Gamma + \text{Ц}}{\text{А} + \text{У}} = 0,9—1,0$.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА РАСПАДА РНК В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ

М. П. ЯВИЧ

Исследование скорости распада РНК представляет интерес при изучении различных физиологических и патологических процессов в организме. В частности, эти сведения важны для понимания механизмов, регулирующих синтез белка при компенсаторном росте органа, процессах регенерации и новообразования тканей.

Данные о скорости распада РНК позволяют оценивать метаболическую стабильность белоксинтезирующей системы клетки. На основании изучения кинетики распада РНК можно измерить период ее полужизни и время кругооборота, а также вычислить процент замещения молекул РНК в единицу времени.

Ниже изложен метод исследования скорости распада РНК в сердечной мышце.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В основу исследования скорости распада РНК положен изотопный метод. Животным вводят ^{14}C -оротовую кислоту и о скорости распада РНК судят по выходу радиоактивной метки из РНК. Период полураспада РНК ($t_{1/2}$) вычисляют графически. Время кругооборота РНК и процент замещения молекул РНК в единицу времени рассчитывают по соответствующим формулам.

РЕАКТИВЫ

1 М раствор КОН; 10% и 5% растворы ТХУ;
0,5 М и 1 М растворы HClO_4 ;
3 М, 0,1 М и 0,05 М растворы HCl .
Этанол; этиловый эфир, ППО, ПОПОП.
Метанол; этиленгликоль; диоксан.
 ^{14}C -оротовая кислота.
Ионообменная смола Дауэкс (H^+) 50 $\times$ 4 (200—400 меш).

ХОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Крысам в течение 3 дней дважды вводят ^{14}C -оротовую кислоту с удельной активностью 60 мКи/мг (из расчета 70 мКи на 100 г массы тела). Затем часть животных забивают и определяют исходную радиоактивность РНК. Оставшихся животных делят на группы и

забивают соответствующие группы животных на 3-й, 5-й, 7-й, 9-й и 11-й дни после определения исходной радиоактивности РНК.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАДИОАКТИВНОСТИ РНК

После декапитации животных сердца немедленно извлекают и отмывают от крови физиологическим раствором. На торсионных весах делают навеску сердечной мышцы (200 мг) и определяют массу всего сердца. Все эти процедуры проводят при температуре 4 °С. Навеску сердечной мышцы гомогенизируют в 30-кратном объеме воды в стеклянном гомогенизаторе типа Поттера при постоянном охлаждении льдом. Макромолекулы осаждают 20% раствором ТХУ до конечной концентрации 5%. Осадки, полученные после центрифугирования, обрабатывают по схеме Шмидта — Тангаузера (1945).

Ход фракционирования кратко заключается в следующем. Осадок трижды отмывают 5% раствором ТХУ от кислоторастворимых соединений, а затем, для удаления фосфолипидов, 80% этанолом, горячей смесью этанола и хлороформа (3:1), а затем этанолом и эфиром. Высушенный материал тщательно размешивают в 2 мл 1 М раствора КОН (из расчета 1 мл раствора на 100 мг сырой массы ткани) и оставляют на 18 ч при 37 °С. После щелочного гидролиза суспензию помещают в ледяную баню и нейтрализуют 1 М раствором HClO_4 . ДНК осаждают путем дальнейшего подкисления 1 М раствором HClO_4 на холоду и вместе с осадком перхлората калия РНК отделяют от гидролизата центрифугированием.

Полученный таким образом раствор рибонуклеотидов используют для анализа. Количество РНК определяют спектрофотометрически по А. С. Спирину (1958), а ее радиоактивность измеряют в сцинтилляционном счетчике в диоксановом растворителе. На основании этих данных рассчитывают удельную радиоактивность РНК (имп/мин/мг) и общую, равную произведению удельной радиоактивности на содержание РНК во всем органе.

ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ГИДРОЛИЗАТА РНК УРИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Около 90% введенной животным оротовой кислоты переходит в уридиловую кислоту, которую можно выделить из гидролизата РНК методом ионообменной хрома-

тографии. Этот метод с использованием смолы Дауэкс (H^+) описан Кацем и Комбом (Katz, Comb, 1963).

К нейтральному раствору рибонуклеотидов добавляют равный объем 0,1 М раствора HCl до конечной концентрации 0,05 М и этот раствор наносят на колонку с Дауэкс (H^+) ($0,9 \times 15$ см), предварительно уравновешенным 0,05 М раствором HCl . Уридиловую кислоту элюируют 5—6 мл 0,05 М раствора HCl , а остальной материал отбрасывают (контроль ведется по поглощению вытекающего из колонки элюата при 254 нм). Количество уридилового нуклеотида определяют спектрофотометрически при 257 нм, а его радиоактивность измеряют в диоксановом растворителе на сцинтилляционном счетчике.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАДИОАКТИВНОСТИ КИСЛОТОРАСТВОРИМОГО ФОНДА СВОБОДНЫХ НУКЛЕОТИДОВ СЕРДЦА

Трихлоруксусные экстракты сердечной мышцы, полученные после осаждения и отмывания макромолекул, объединяют и многократно встряхивают с эфиром для удаления ТХУ. Радиоактивность таких экстрактов измеряют с помощью сцинтилляционного счетчика в диоксановом растворителе и относят ее к 100 мг сырой массы ткани.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРИОДА ПОЛУРАСПАДА И ВРЕМЕНИ КРУГООБОРОТА РНК СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Согласно литературным данным, продукты распада РНК, в частности пиримидиновые основания, не подвергаются реутилизации (Hurlbert, Potter, 1952). В сердечной мышце уровень радиоактивности РНК в 10—15 раз превышает ^{14}C -активность фонда кислоторастворимых свободных нуклеотидов в расчете на единицу массы ткани. Это позволяет думать, что продукты распада РНК существенно не подвергаются реутилизации в процессе синтеза РНК. Ход изменения радиоактивности гидролизата РНК в наших опытах совпадал с ходом изменения радиоактивности выделенного из гидролизата уридилового нуклеотида; следовательно, выход метки из всех продуктов гидролизата РНК и из уридилового нуклеотида протекал одинаково.

Для оценки скорости распада РНК рассчитывают ее радиоактивность во всем сердце (тотальная радиоактивность РНК). Следует иметь в виду, что снижение удельной радиоактивности РНК в зависимости от времени после введения изотопа отражает два одновременно протекающих противоположных процесса: распад меченой РНК и синтез новых немеченых молекул. При усиленном росте органа (например, при гипертрофии сердечной мышцы) синтез РНК будет превалировать над распадом. Таким образом, для того чтобы судить о реальном процессе распада, независимого от эффекта «разбавления» дополнительным немеченым материалом, необходимо обратиться к изменению тотальной радиоактивности РНК.

Ход изменения тотальной радиоактивности РНК в зависимости от времени после введения изотопа выражают в полулогарифмических координатах (рис. 34). Чтобы вычислить период полураспада РНК ($t_{1/2}$), по оси ординат находят величину, составляющую половину от исходной радиоактивности РНК, проводят горизонтальную линию и из точки ее пересечения с кривой радиоактивности — время опускают перпендикуляр на ось абсцисс.

Время кругооборота (T) РНК и процент замещения или распада молекул РНК в единицу времени вычисляют по следующим формулам:

$$T = t_{1/2} (\ln 2); \% \text{ замещения} = 100 \ln 2 / t_{1/2}.$$

где $t_{1/2}$ — период полураспада, определяемый из графика (см. рис. 34). Для РНК сердечной мышцы $t_{1/2}$ равен 7,4 сут, T — 10,4 сут, а замещение РНК в сутки составляет 9,3%.

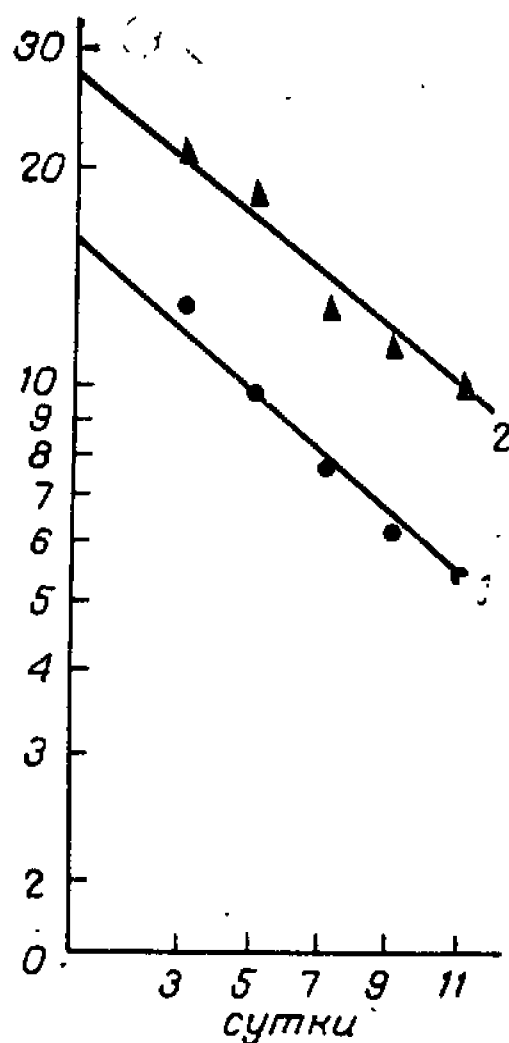


Рис. 34. Динамика распада РНК в сердечной мышце крысы.

1 — удельная радиоактивность РНК, 2 — тотальная радиоактивность РНК.

На ординате — радиоактивность в имп/мин · 10⁴ на все сердце; на абсциссе — время после введения ¹⁴С-оротовой кислоты в сутках.

Сведения о распаде РНК в единицу времени в сочетании с данными о ее приросте позволяют оценить не только скорость синтеза РНК, но и реальное количество РНК, которое образуется в тканях. Это представляет особый интерес при исследовании растущих тканей (например, при компенсаторной гиперфункции сердечной мышцы).

В заключение следует отметить, что данные о скорости распада суммарной РНК по существу отражают скорость распада рибосом сердца, так как рибосомная РНК составляет 85% всех РНК клетки.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

А. В. ПОСПЕЛОВА

Для изучения химического состава, строения и функций плазматических мембран необходимо уметь выделять их в чистом виде.

Выделение субклеточных структур любым методом включает гомогенизацию ткани с целью разрушения клеток при минимальном повреждении отдельных субклеточных образований и фракционирование субклеточных структур на основе различий скорости седиментации, в частности в условиях градиента плотности. Средой для выделения плазматических мембран обычно служат растворы NaHCO_3 или сахарозы, иногда с добавлением 2 мМ CaCl_2 (С. Я. Давыдова, 1968). Для дальнейшей очистки мембран используют метод градиентного ультрацентрифугирования в растворах сахарозы в пределах плотности 1,22—1,16 (Emmelot e. a., 1964).

Было проведено (Charles, John, 1972) сравнение трех методов препаративного выделения плазматических мембран по их выходу и чистоте: метод Невилля (Neville, 1960), в котором используют 1 мМ (гипотонический) раствор NaHCO_3 для гомогенизации и промывания мембран, метод Рея, который отличается добавлением 0,5 мМ CaCl_2 к 1 мМ раствору NaHCO_3 и расходом большого объема растворов для гомогенизации и промывания, и, наконец, метод, в котором для гомогенизации и промывания применяют растворы 0,25 М сахарозы, 0,5 мМ CaCl_2 и 5 мМ трис (Takeuchi, Terayama, 1965).

Плазматические мембраны выделяли из печени крыс. Гомогенизацию проводили в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком, все гомогенаты фильтровали через четыре слоя ткани, центрифугировали при 61 000 g в течение 2 ч в растворе сахарозы с градиентом плотности 1,22, 1,18, 1,16. Два конечных промывания очищенных мембран производили водой. Наиболее чистыми оказались плазматические мембраны клеток печени, выделенные по методу Невилля; наибольший выход мембран был получен при выделении по Рею.

Мы, как и многие другие исследователи, для выделения плазматических мембран из печени крыс использовали метод Невилля с небольшими изменениями, который изложен ниже.

РЕАКТИВЫ

1 мМ раствор NaHCO_3 , подкисленный до pH 7,5.

Растворы сахарозы плотностью 1,34, 1,18, 1,16.

450 г сахарозы растворяют в 0,5 л воды при нагревании на водяной бане и постоянном помешивании. После охлаждения раствор постепенно разбавляют водой до получения соответствующей плотности — 1,34, 1,18 и 1,16 (контролируют ареометром).

ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА

Животных обезглавливают, вскрывают брюшную полость, *in situ* надрезают воротную вену и в нее вставляют канюлю, через которую производят перфузию печени охлажденным 1 мМ раствором NaHCO_3 до тех пор, пока оттекающая жидкость не перестанет окрашиваться кровью. Затем печень извлекают из брюшной полости, тщательно просушивают фильтровальной бумагой, освобождают от соединительной ткани, взвешивают и измельчают ножницами. Все перечисленные операции необходимо проводить в холодной комнате при 2—4 °C.

ХОД ВЫДЕЛЕНИЯ

5 г печени гомогенизируют в 25 мл 1 мМ раствора NaHCO_3 (pH 7,5) в стеклянном гомогенизаторе типа Поттера—Эльвегейма движениями тефлонового пестика рукой вверх—вниз 35—40 раз. Полноту разрушения кле-

гок после гомогенизации контролируют в фазово-контрастном микроскопе — гомогенат должен содержать не более 5% неразрушенных клеток. Полученный гомогенат разбавляют 500 мл того же раствора NaHCO_3 и встряхивают в течение 2 мин. Разбавленный гомогенат печени фильтруют через шесть слоев марли и центрифугируют при 1200 g 10 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, верхний, розовый, слой осадка отделяют от нижнего, коричневого, слоя. Коричневый осадок отбрасывают. Полученный розовый осадок мембран суспендируют в среде для гомогенизации и центрифугируют при тех же условиях. Эту процедуру повторяют 3 раза.

Осадок мембран суспендируют в воде и переносят в центрифужную пробирку ротора с откидными стаканами (бакет-ротор) препаративной ультрацентрифуги. К 1,2 мл суспензии добавляют по каплям при перемешивании 2,1 мл сахарозы с плотностью 1,34. Получают плотность смеси — 1,20. На эту смесь осторожно наслаивают 1 мл раствора сахарозы с плотностью 1,18 и затем 1 мл раствора сахарозы с плотностью 1,16. Центрифугируют 75 мин при 100 000 g.

В результате центрифугирования появляются два отчетливых слоя на границах плотностей сахарозы 1,20—1,18 и 1,18—1,16. Плазматические мембраны выделяются в зоне между растворами сахарозы с плотностями 1,18 и 1,16. Между растворами сахарозы с плотностями 1,20 и 1,18 концентрируются мембраны цитоплазматической сети и фрагменты митохондрий. На поверхности жидкости обычно образуется жировая пленка, на дно пробирки оседают фрагменты ядер и митохондрии, а также неразрушенные клетки.

Слой плазматических мембран собирают из пробирки, проколов ее на уровне этого слоя или в дне. Если прокол пробирки неприемлем, то этот слой плазматических мембран отсасывают, что следует делать очень осторожно, удалив сначала жировую пленку. Полученные препараты плазматических мембран дважды отмывают дистиллированной водой.

Чистоту препаратов плазматических мембран проверяют в электронном микроскопе и по наличию активности ферментов-маркеров (АТФ-азы и 5'-нуклеотидазы). Загрязненность изолированных плазматических мембран микросомами контролируют по присутствию глюкозо-6-фосфатазы, митохондриями — по наличию сукцинатде-

гидрогеназы. Загрязнения препаратов лизосомами определяют по уровню активности кислой фосфатазы, фрагментами ядер — по присутствию ДНК.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕМБРАН ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СЕТИ

А. Д. ЗЛАТОПОЛЬСКИЙ

При электронномикроскопическом исследовании срезов тканей, секретирующих большое количество белков, обнаруживают изобилие внутриклеточных мембранных структур — мембран цитоплазматической сети (ЦС, эндоплазматического ретикулума)¹. Мембраны ЦС образуют протяженные полости и делят клетку на отсеки. Иногда наблюдают контактирование мембран ЦС с внешней ядерной мембраной и с мембраной митохондрий. Предполагают, что мембраны ядерная, ЦС и плазматическая образуют единую мембранную сеть клетки.

Мембраны ЦС состоят из двух морфологически заметно отличающихся видов: мембран зернистой цитоплазматической сети (ЗЦС) или шероховатых мембран, поверхность которых покрыта рибосомами, и мембран незернистой цитоплазматической сети (НЦС) или гладких мембран, не имеющих на поверхности рибосом. Часто участок мембраны, лишенный рибосом, находится рядом с участком мембраны, нагруженным рибосомами.

Мембраны ЗЦС и НЦС близки по строению и химическому составу. Некоторые функции являются общими для обоих типов мембран; известно, что ряд ферментов имеется как в ЗЦС, так и в НЦС. Через полости ЦС транспортируются секретируемые клеткой белки. Каждый тип мембран имеет и свои индивидуальные функции: синтез и ферментативная модификация синтезируемых белков происходит на ЗЦС, синтез фосфолипидов и наличие детоксифицирующих ферментов характерны для НЦС.

Совершенствование методов фракционирования субклеточных структур необходимо для дальнейшего изучения функций мембран ЦС.

¹ Названия клеточных структур приведены в соответствии с Международной гистологической номенклатурой.

ПРИНЦИПЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕМБРАН ЦС

Разрушение клеток вызывает фрагментацию мембран и образование пузырьков (везикул) разного размера и плавучей плотности. Для выделения и разделения мембран ЦС используют методы дифференциального и градиентного центрифугирования и их сочетание. Метод дифференциального центрифугирования позволяет отделить мембранные пузырьки от других субклеточных структур, отличающихся по массе, следовательно, и по скорости седиментации. Таким методом можно получить тотальный препарат мембран (микросомную фракцию), содержащий мембраны НЦС и ЗЦС. Метод градиентного центрифугирования, позволяющий разделять структуры по плавучей плотности, используют для получения НЦС и ЗЦС. Сочетанием этих методов можно увеличить чистоту препаратов и выход материала мембран.

ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К МЕТОДАМ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕМБРАН ЦС

Так как существующие методы выделения мембран ЦС нуждаются в дальнейшей разработке, мы приводим требования, которыми следует руководствоваться при выборе условий выделения мембран.

1. Постоянство состава (соотношения белков, РНК и липидов) и удельных активностей ферментов мембран.

2. Чистота препарата — отсутствие структур, имеющих близкие константы седиментации и (или) плавучие плотности; обычно это митохондрии, лизосомы, пероксисомы, свободные полирибосомы, растворимые белки цитоплазмы, в некоторых случаях возможно также загрязнение нуклеопротеидами ядра.

3. Полнота выхода мембран.

Существующие методы позволяют из центрифугата после осаждения митохондрий получать препараты ЗЦС и НЦС, не содержащие примесей других субклеточных структур, и препараты ЗЦС и НЦС быстроседиментирующие, содержащие митохондрии. Следует подчеркнуть, что быстроседиментирующие и медленноседиментирующие типы мембран ЦС имеют, по-видимому, качественные различия.

Ниже описаны методы получения мембран ЦС, разработанные для клеток печени. Эти методы могут быть использованы (иногда с некоторыми изменениями) для получения мембран ЦС из других органов животных.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ МЕМБРАН ЗЦС И НЦС, СВОБОДНЫХ ОТ ПРИМЕСЕЙ ДРУГИХ СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР

РАСТВОРЫ

Раствор 25 мМ трис-НСl (pH_{20° 7,6), 50 мМ КСl, 5 мМ MgCl_2 , 0,25 М сахарозы (сокращенно ТКМС).

Раствор 25 мМ трис-НСl (pH_{20° 7,6), 50 мМ КСl, 5 мМ MgCl_2 (далее будет сокращенно называться раствором ТКМ).

1,3 М и 2 М растворы сахарозы, приготовленные на ТКМ.

Приготовление постмитохондриальной надосадочной жидкости

Животных декапитируют, быстро извлекают печень, ополаскивают ледяной деионизированной водой и помещают в охлажденный раствор ТКМС. Все последующие операции проводят при $2-3^\circ\text{C}$. Печень отмывают раствором ТКМС от крови и продавливают через пресс (с отверстиями 1 мм в диаметре) или измельчают ножницами. После взвешивания печеночную массу вместе с раствором ТКМС помещают в гомогенизатор Поттера—Эльвегейма при соотношении масса печени/объем раствора 1/3. Гомогенизацию проводят при скорости вращения пестика 1500 об/мин, десятью ходами. Гомогенат фильтруют через 2 слоя марли и центрифугируют при 17 000 $g_{\text{макс}}$ 10 мин. Постмитохондриальную надосадочную жидкость фильтруют через 4 слоя марли.

Выделение мембран НЦС и ЗЦС из постмитохондриальной надосадочной жидкости

В пробирки углового ротора 50 Ti ультрацентрифуги «Спинко» последовательно наслаивают 3,5 мл 2 М раствора сахарозы, 3,5 мл 1,3 М раствора сахарозы и 5,5 мл постмитохондриальной жидкости. Центрифугируют при 160 000 $g_{\text{макс}}$ (45 000 об/мин) 14 ч. На границе слоев 1,3 М раствор сахарозы — постмитохондриальная жидкость можно видеть несколько узких полос незернистых мембран, на границе слоев 1,3 — 2 М растворов сахаро-

зы видны зернистые мембраны, расположенные, так же как и незернистые, в виде набора дискретных полос, т. е. имеющие отличающуюся плавучую плотность; в осадке находятся свободные полирибосомы. Мембраны извлекают при помощи шприца с длинной иглой, разбавляют в 3—5 раз раствором ТКМ и осаждают при 90 000 $g_{\text{макс}}$ (28 000 об/мин) 60 мин в угловом роторе. Осадки мембран суспендируют в растворе ТКМС при помощи пипетки с резиновой грушей. Обычно мембраны хранят в осадках не более 2 сут во льду.

Потери мембран при использовании описанного метода составляют 70—80%. Этот метод выделения мембран ЦС был применен нами при изучении метаболизма полирибосом (А. Д. Златопольский и др., 1973).

Возможны следующие модификации этого метода:

1. Время центрифугирования может быть сокращено, если не требуется полного отделения несвязанных с мембранами рибосом от ЗЦС. Например, центрифугирования в 50 Ti роторе при 45 000 об/мин (160 000 $g_{\text{макс}}$) в течение 3 ч достаточно для разделения ЗЦС и НЦС. В этом случае ЗЦС и НЦС будут представлены двумя сплошными широкими полосами.

2. В том случае, когда не требуется отделять свободные рибосомы от ЗЦС, нет необходимости наслаивать на дно пробирки 2 М раствор сахарозы. Тогда свободные полирибосомы и мембраны ЗЦС окажутся в осадке.

3. Для получения чистого препарата мембран НЦС рекомендуется использовать их флотацию из раствора сахарозы, имеющего бóльшую плотность, чем НЦС, и меньшую плотность, чем ЗЦС. Для этого к 1,47 мл 2 М раствора сахарозы добавляют 1 мл постмитохондриальной надосадочной жидкости (конечная концентрация сахарозы $\sim 1,3$ М) и смесь наслаивают на 2 М раствор сахарозы. Сверху необходимо наложить небольшой объем раствора ТКМС.

4. Промежуточный слой в ступенчатом градиенте сахарозы берут в пределах концентрации 1,2—1,4 М (обычно 1,3 М). Концентрацию сахарозы промежуточного слоя увеличивают в тех случаях, когда необходимо получить мембраны ЗЦС, заведомо свободные от мембран НЦС.

Если же необходимо получить возможно более чистый препарат мембран НЦС, то концентрацию сахарозы промежуточного слоя понижают.

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ БЫСТРО- СЕДИМЕНТИРУЮЩИХ МЕМБРАН ЦС

Стандартная процедура выделения мембран ЦС сводится к получению постмитохондриальной надосадочной жидкости (10 000—20 000 g, 10—15 мин) и последующему фракционированию ЗЦС и НЦС в ступенчатом градиенте плотности сахарозы. Однако вместе с ядрами и митохондриями теряется 70—80% мембран ЦС (измерено по активности глюкозо-6-фосфатазы и по содержанию РНК), причем около 50% мембран осаждаются при 600 g и 10% при 6000 g (Lewis, Tata, 1973). При электронномикроскопическом изучении мембраны ЗЦС этого быстроседиментирующего типа выглядят как пачки продолговатых везикул, относительно большого размера, контактирующие иногда с митохондриями. Внешний вид этих мембран мало отличается от внешнего вида мембран ЗЦС, обнаруживаемых на клеточном срезе вблизи ядра. Эти наблюдения свидетельствуют о качественном различии этих мембран от мембран, полученных из постмитохондриальной надосадочной жидкости. Поэтому мы приводим метод выделения этих мембран, хотя, по-видимому, он и нуждается в дальнейшей доработке.

25 mM раствор ацетата магния; 0,35 M раствор сахарозы, pH_{20°} 7,6 (сокращенно раствор МС).

Осаждение быстроседиментирующих мембран ЦС

Печень гомогенизируют в 2,5 объема раствора МС 11 ходами поршня в гомогенизаторе Поттера—Эльвегейма при скорости вращения пестика 800 об/мин. Гомогенат фильтруют через 2 слоя марли и центрифугируют при 640 g 10 мин. В осадок попадают эритроциты, ядра клеток, митохондрии и быстроседиментирующие мембраны ЦС. Активность кислой фосфатазы и каталазы в этой работе не определяли, поэтому неизвестно, в какой фракции находятся лизосомы и пероксисомы.

Освобождение быстроседиментирующих мембран ЦС от эритроцитов и ядер

Осадок суспендируют в 5 объемах раствора МС. Порции суспензии по 12,5 мл разводят 7,5 мл раствора МС и добавляют 6 мл деионизированной воды. На дно

пробирки помещают 18 мл раствора МС, а сверху наслаивают разведенную суспензию и центрифугируют при 360 g 10 мин. При этом эритроциты и ядра количественно осаждаются.

Приготовление ЗЦС и НЦС фракций быстроседиментирующих мембран ЦС

Надосадочную жидкость осаждают центрифугированием при 15 000 g в течение 15 мин в стеклянных стаканах емкостью 50 мл. Осадки суспендируют в 5—10 мл раствора МС и 12,5 мл суспензии наслаивают на 6,5 мл 1,3 М раствора сахарозы и центрифугируют при 105 000 g в течение 2 ч 30 мин.

В результате этого в осадках получают быстроседиментирующую фракцию ЗЦС, а в промежуточной фазе—фракцию НЦС.

Получение мембран ЦС из постядерного супернатанта

Выделение производят обычным способом: жидкость, полученную при 640 g, центрифугируют при 6000 g (дважды) для удаления митохондрий; постмитохондриальную надосадочную жидкость наслаивают на ступенчатый градиент сахарозы и проводят разделение мембран ЗЦС и НЦС, как описано выше.

Этот метод позволяет получить два типа качественно отличных мембран ЦС, каждый из которых содержит мембраны НЦС и ЗЦС. Потери мембран ЦС при использовании этого метода составляют 30—40 %.

Adelman и соавторы (1973) предложили метод получения мембран, позволяющий увеличить выход мембран в постмитохондриальной надосадочной жидкости до 50 %. Это достигается использованием в ходе выделения растворов концентрированной сахарозы, не содержащей ионов, и двукратным повторным суспендированием осадка митохондрий с последующим центрифугированием полученной суспензии. Однако и этот метод не лишен недостатков. В частности, описанная процедура получения постмитохондриальной надосадочной жидкости длительна, не позволяет получать мембраны в большом количестве и выделенные этим методом мембраны загрязнены ферментами лизосом и пероксисом.

ВЫДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА РОСТА НЕРВНОЙ ТКАНИ ИЗ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ МЫШЕЙ

Н. А. КУЗЬМИЧЕВА

Фактор роста нервной ткани (ФРНТ), впервые обнаруженный в мышинной саркоме 180 и 37, усиливает рост и дифференцировку симпатических и эмбриональных сенсорных нервных клеток. Позднее ФРНТ был обнаружен в змеином яде и в слюнных железах мышей, причем в гораздо большем количестве, чем в саркоме. Было показано, что это активное вещество белковой природы (Cohen, 1960).

Введение ФРНТ животному, начиная с первого дня рождения, вызывает гипертрофию симпатической нервной системы. Такое постнатальное введение ФРНТ не влияет на нейроны сенсорных ганглиев, так как сенсорные клетки чувствительны к ФРНТ только в эмбриональном периоде.

Антитела, специфичные к ФРНТ, вызывают деструкцию симпатических ганглиев.

ФРНТ, будучи добавлен в среду, в которой культивируются симпатические или эмбриональные сенсорные ганглии, вызывает у них радиальный рост волокон. В зависимости от концентрации ФРНТ в культуральной среде этот волокнистый венец вокруг ганглиев может иметь различную величину и плотность. Этот феномен используют для определения содержания ФРНТ в исследуемой жидкости.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФРНТ

Реактивы и материалы: тромбин, культуральная среда № 199, плазма крови петуха.

В процессе выделения ФРНТ его биологическую активность определяют с помощью культуры сенсорных ганглиев 7—9-дневного куриного эмбриона по методу Леви-Монтальчини и Хамбургера (Levi-Montalcini, Hamburger, 1953).

Сенсорные ганглии куриного эмбриона помещают в каплю раствора, состоящего из 0,025 мл плазмы крови петуха, 0,025 мл раствора тромбина в среде № 199 (0,05 мг/мл) и 0,025 мл раствора, исследуемого на наличие ФРНТ и его количество. Пробу инкубируют в те-

чение 18 ч при 37 °С. По истечении срока инкубации при наличии в растворе ФРНТ можно наблюдать радиальный рост аксонов от ганглия. В зависимости от плотности и ширины образовавшегося венца положительный ответ на присутствие ФРНТ оценивают по 5-балльной шкале от 0 до +4. За биологическую единицу ФРНТ (1 биол. ед.) принимают то его количество в 1 мл культуральной среды, которое вызывает +3 — ответ сенсорных ганглиев за 18 ч инкубации.

ВЫДЕЛЕНИЕ ФРНТ

Реактивы: растворы для определения белка по Лоури; сульфат аммония; хлорид кальция, двузамещенный фосфат натрия; сефадексы G-100 и G-150.

В качестве источника для выделения ФРНТ берут слюнные железы мышей, так как содержание в них этого активного вещества наибольшее. Описанный ниже метод выделения ФРНТ представляет собой модификацию метода Варона и соавторов (Varon e. a., 1967).

20 г подчелюстных слюнных желез самцов взрослых мышей гомогенизируют в 330 мл холодной дистиллированной воды. Количество белка в гомогенате, определенное по методу Лоури, составляет 2400 мг (табл. 28). Гомогенат центрифугируют при 18 000 g в течение 30 мин, осадок отбрасывают.

Из надосадочной жидкости, содержащей около 1500 мг общего белка, с помощью насыщенного раствора сульфата аммония, рН которого раствором аммиака доведен до значения 7,0, осаждают активную фракцию белков. Активный белок выпадает в осадок в интервале 0,5—0,75 насыщения. После создания в надосадочной жидкости 0,5 насыщения сульфата аммония (из расчета 10 мл насыщенного раствора сульфата аммония на 10 мл центрифугата) смесь оставляют на холоду в течение 1 ч. Затем центрифугируют 30 мин, осадок отбрасывают. К центрифугату снова добавляют раствор сульфата аммония до 0,75 насыщения (на 10 мл центрифугата добавляют 10 мл насыщенного раствора сульфата аммония). Смесь выдерживают на холоду в течение 3 ч, затем центрифугируют. В осадке, содержащем около 950 мг белка, обнаруживают биологическую активность. Осадок делят на две равные части, каждую из них растворяют в 10 мл воды, рН которой был доведен раство-

Выделение ФРНТ из слюнных желез мышей (пример опыта)

Фракция	Общее количество белка, мг	Удельная активность		Общее количество ФРНТ, биол. ед. $\times 10^{-6}$
		биол. ед./мг белка	мкг белка/биол. ед.	
Гомогенат	2400	2000	0,500	4,8
Надосадочная жидкость	1560	2756	0,366	4,3
Фракция, осажденная сульфатом аммония при 0,7 насыщения	948	3375	0,300	3,2
Фракция G-100	174	16667	0,060	2,9
Фракция брушита	93	26881	0,037	2,5
Фракция G-150	42	52381	0,019	2,2

ром аммиака до значения 7,0, и наносят на колонку с сефадексом G-100 (длина 125 см, диаметр 4 см). Колонку уравнивают и промывают водой (рН 7,0). Скорость протекания составляет 40—50 мл/ч. Оптическую плотность растворов определяют спектрофотометрически с помощью СФ-44 при 280 нм. Биологически активными оказались белки, соответствующие спаду первого пика на элюционной кривой (фракция G-100).

Каждую из двух фракций G-100, содержащую около 85 мг белка, пропускают через колонку брушита. Брушит представляет собой фосфорную соль кальция — $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, выпадающую в осадок при смешивании растворов хлорида кальция и двузамещенного фосфата натрия. Для получения необходимого для одной колонки количества брушита смешивают по каплям 300 мл 0,25 М раствора хлорида кальция и 300 мл 0,25 М раствора двузамещенного фосфата натрия. Образовавшийся осадок 4—5 раз промывают водой (рН 7,0) с последующей декантацией, а затем заполняют им колонку (длина 20 см, диаметр 2 см). Кристаллы фосфорной соли кальция имеют звездчатую форму и за счет большой поверхности хорошо адсорбируют белки.

Фракцию G-100 объемом 150—200 мл наносят на колонку с брушитом. Затем колонку элюируют последовательно 0,01 М, 0,05 М и 0,1 М растворами однозамещенного фосфата натрия, рН которых был доведен до значения 7,0. Скорость вытекания раствора из колонки составляет 60—70 мл/ч. Биологическая активность связана

с белковой фракцией, которая элюируется с колонки 0,05 М раствором однозамещенного фосфата натрия.

Биологически активные фракции, снятые с двух колонок брушита, объединяют. Белки в объединенной фракции осаждают насыщенным раствором сульфата аммония (рН 7,0) при 0,7 насыщения.

В растворе сульфата аммония препарат сохраняют на холоду до последнего этапа выделения ФРНТ — гель-фильтрации через сефадекс G-150. Для этого смесь центрифугируют, осадок растворяют в 3 мл воды (рН 7,0) и наносят на колонку с сефадексом G-150 (длина 95 см, диаметр 2,5 см). Количество наносимого белка соответствует примерно 90 мг. Колонку уравнивают и промывают водой (рН 7,0). Скорость протекания 20—25 мл/ч. Биологической активностью обладает белковая фракция, соответствующая первому пику на кривой элюции (фракция G-150). Белок этой фракции (около 42 мг) лиофильно высушивают и хранят на холоду.

Как видно из данных, представленных в табл. 28, удельная активность конечного продукта очистки (фракция G-150) составляет более 52 000 биол. ед. на 1 мг белка, следовательно, одной биол. ед. соответствует около 0,02 мкг белка. Такое значение удельной биологической активности ФРНТ соответствует результатам других авторов (Vagon e. a., 1967). Активный белок во фракции G-150 имеет 25—30-кратную степень очистки по сравнению с гомогенатом слюнных желез.

Полученный белковый материал при ультрацентрифугировании седиментирует одним несимметричным пиком. Коэффициент седиментации основного компонента, составляющего 85—90% всего материала, равен 7,1 S.

Полученный описанным методом препарат ФРНТ имеет высокую биологическую активность и не токсичен для мышей.

МЕТОД ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ МЕЧЕНЫХ КЛЕТОЧНЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ С ПОМОЩЬЮ МИЛЛИПОРОВЫХ ФИЛЬТРОВ

О. Ю. АБАКУМОВА

Включение радиоактивных предшественников широко используют при исследовании синтеза белка, нуклеиновых кислот, липидов и других макромолекул животных

клеток. Обычно употребляют специфические предшественники определенного класса макромолекул, и измерение включения метки в эти макромолекулы сводится к их выделению и определению удельной радиоактивности. Однако для изучения различных сторон обмена веществ, особенно при применении канцерогенных или химиотерапевтических веществ, используют либо неспецифический радиоактивный предшественник, включающийся во все клеточные макромолекулы, либо соединения, содержащие ^{14}C в алкильной или карбамоильной группах и способные алкилировать или карбамоилировать все клеточные макромолекулы. При определении включения таких веществ в макромолекулы необходимо выделять и очищать каждый класс исследуемых молекул (РНК, ДНК, липиды, белки). Для фракционирования макромолекул клеток используют миллипоровые (мембранные) фильтры. В основе этого метода лежат классические методы Шмидта и Тангаузера и Шнейдера, модифицированные таким образом, чтобы свести к минимуму загрязнение конечной исследуемой фракции того или иного класса макромолекул другими веществами клетки.

РЕАКТИВЫ

5%, 10%, 20% и 50% растворы трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

70% этанол; 0,5 М раствор NaOH; 20% раствор тритона X-100; серный эфир (для наркоза).

Толуол сцинтилляционный; 3,5 г ППО и 0,1 г ПОПОП в 1 л толуола.

Раствор А: 0,25 М сахароза, 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl, 25 мМ трис-HCl буфер (pH 7,6).

Раствор Б: 1 мМ MgCl_2 , 10 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4).

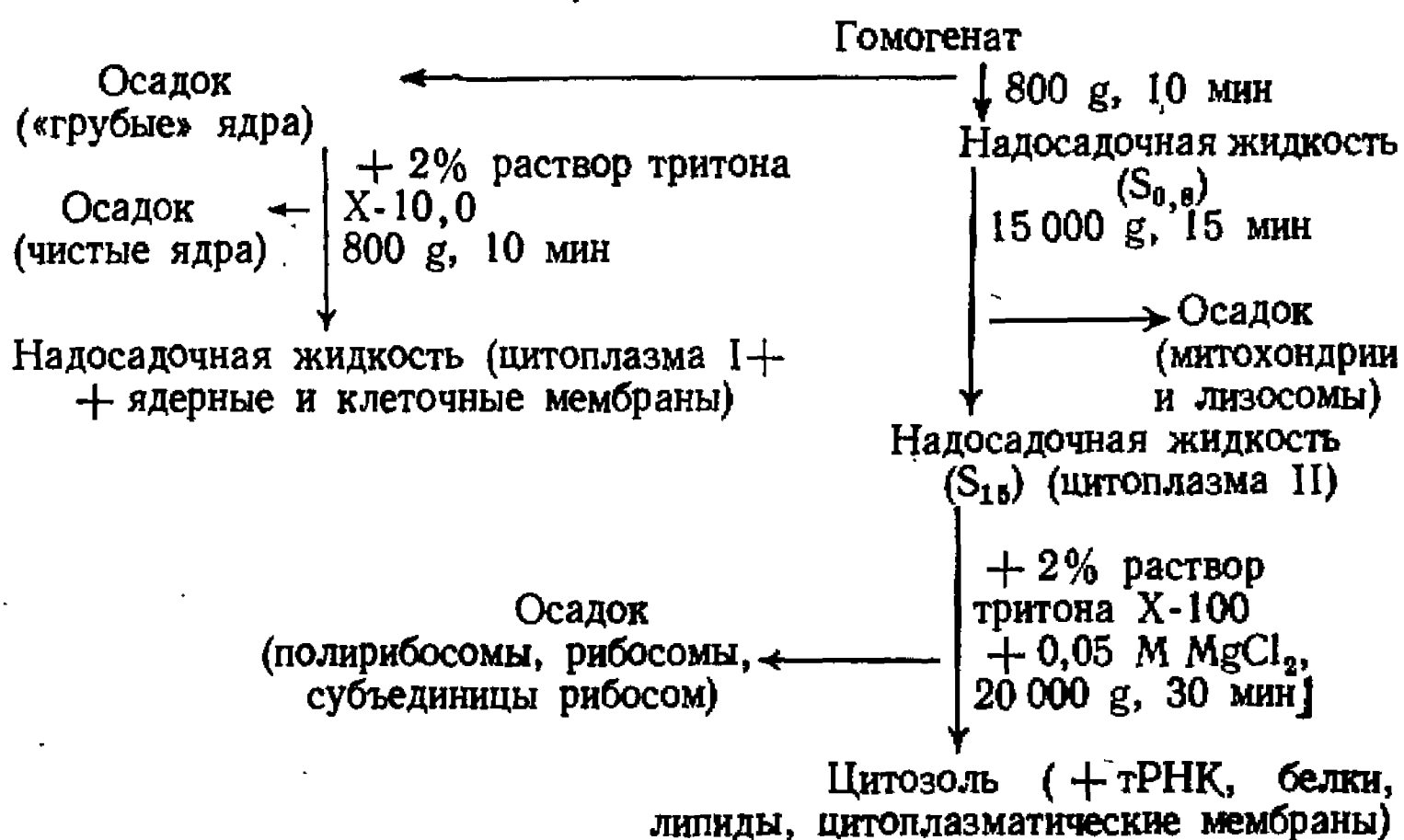
Раствор Брея: 400 мл диоксана, 100 мл метанола (или этанола), 10 мл этиленгликоля, 30 г сублимированного нафталина, 2 г ППО и 0,2 г ПОПОП.

Мембранные СЫНПОР или миллипоровые фильтры Aufs (№ 3), ЧССР; диаметр пор 1,5 мкм.

ПОЛУЧЕНИЕ ГОМОГЕНАТА И ЕГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ

Исследуемую ткань или орган гомогенизируют на холоду в 3 объемах раствора А (по отношению к массе органа или ткани, г/мл) в гомогенизаторе с тефлоновым

пестиком. Гомогенат фракционируют по следующей схеме:



При таком фракционировании точно взвешивают орган или ткань, измеряют объемы гомогената и каждой фракции, что необходимо для дальнейшего пересчета радиоактивности макромолекул на 1 г сырой массы и на 1 мг ДНК ткани. Осадок ядер и осадок митохондрий суспендируют в растворе А. Осадок полирибосом суспендируют в ледяной воде и диализуют в течение 2—12 ч против раствора Б.

Из каждой фракции отбирают 12 проб по 0,1 мл, помещают их в ледяную баню, добавляют 2 мл ледяной H_2O и 2 мл холодного 20% раствора ТХУ. Оставляют на 30 мин при $0^\circ C$. Затем 3 пробы осаждают на мембранные фильтры (МФ), осадок дважды промывают 5% раствором ТХУ и высушивают либо этанолом, либо под лампой при температуре $50-60^\circ C$. Полученный на МФ осадок содержит все меченые макромолекулы (РНК, ДНК, липиды, белки).

Оставшиеся 9 проб центрифугируют при 3000 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость собирают для измерения радиоактивности в кислоторастворимой фракции. К осадку приливают 3 мл 70% этанола и оставляют стоять 30 мин при комнатной температуре, а затем центрифугируют 5 мин при 3000 g. Полученный осадок дважды суспендируют в этаноле с последующей инкуба-

цией при 40°C в течение 10 мин. 3 пробы из 9 наносят на МФ и высушивают. Осадок содержит РНК, ДНК и белки, липидная фракция удалена при обработке этанолом.

Из остальных 6 проб центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин удаляют этанол и к осадкам приливают по 2 мл 0,5 М раствора NaOH. Пробы помещают в термостат при 37°C на 40 мин. За это время вся РНК (и только РНК), имеющаяся в пробе, должна гидролизоваться и перейти в кислоторастворимое состояние. По окончании гидролиза пробы помещают в лед и к ним добавляют 0,6 мл 50% раствора ТХУ. Через 30 мин инкубации в ледяной бане 3 пробы из 6 осаждают на МФ, дважды промывают 5% раствором ТХУ, МФ высушивают. Здесь в осадке находятся белки и ДНК.

Оставшиеся три пробы центрифугируют 5 мин при 3—4000 g; надосадочную жидкость сливают, к осадкам добавляют 2 мл 5% раствора ТХУ и нагревают 15 мин при 90°C для гидролиза ДНК. После этого пробы охлаждают и осаждают на МФ, дважды промывая 5% раствором ТХУ. В осадке остаются только белки.

В растворе полирибосом после диализа определяют концентрацию материала и чистоту препарата (В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1969), затем отбирают 6 проб по 0,1—0,5 мл, содержащих 1—1,5 мг полирибосом. К 3 пробам добавляют 3 мл 10% раствора ТХУ, помещают в лед на 30 мин и осаждают на МФ, а к оставшимся 3 добавляют 2 мл 0,5 М раствора NaOH для гидролиза РНК (см. выше). После гидролиза РНК на МФ осаждают рибосомные белки. По разности радиоактивности (РА) осадков до и после гидролиза определяют величину РА рибосомной РНК.

Радиоактивность полученных осадков измеряют в сцинтилляционном счетчике, в толуоловом сцинтилляторе. РА кислоторастворимой фракции определяют после удаления из нее ТХУ эфиром. В качестве сцинтиллятора используют раствор Брея. Для расчета РА отдельных классов макромолекул применяют следующий ход рассуждения.

Если A — РА всех макромолекул на фильтре и a_1 — РА фильтра после удаления липидов, то $(A - a_1) = \text{РА суммарных липидов}$.

Если a_2 — РА фильтра после удаления РНК, то $(a_1 - a_2) = \text{РА РНК}$.

Количество РНК (в % от всей меченой РНК), экстрагируемой этанолом из различных фракций разных тканей мышей при осаждении 10% и 20% растворами ТХУ

Ткани	Фракции гомогената	РНК, экстрагируемая этанолом при осаждении, в %	
		10% раствор ТХУ	20% раствор ТХУ
Печень мышей	Гомогенат	26	21
	S _{0.8}	27	29
	S ₁₅	23	7
	Митохондрии	20	9
	Ядра	14	3
Гепатома 22А	Гомогенат	20	11
	S _{0.8}	37	42
	S ₁₅	37	33
	Митохондрии	47	32
	Ядра	0	0
Плазмоцитома МОРС-21	Гомогенат	24	3
	S _{0.8}	18	0
	Митохондрии	28	29
Селезенка мышей	Гомогенат	9	10
Почки мышей	Гомогенат	32	9

Если a_3 — РА фильтра после удаления ДНК — соответствует РА белков, то $(a_2 - a_3) = \text{РА ДНК}$.

В каждой фракции гомогената определяют количество РНК и ДНК по Флеку и Монро в модификации Блобеля и Поттера (М. Г. Трудюлюбова, см. с. 313) и белка по методу Лоури. Величину РА рассчитывают в имп/мин/мг ДНК ткани. Рассчитывают также удельную РА РНК, ДНК и белка, выражая ее в имп/мин/мг соответствующих макромолекул.

Предлагаемый метод определения радиоактивности макромолекул клетки имеет один недостаток: при экстракции липидов этанолом с ними вместе экстрагируется часть РНК (Hallinan e. a., 1963). Хотя Kennell (1970) утверждает, что при осаждении кислоторастворимой фракции гомогената печени крыс 10% или более концен-

трированной ТХУ потери РНК значительно снижаются или отсутствуют, приведенные ниже данные (табл. 29), полученные нами, свидетельствуют о различной степени экстракции РНК этанолом из разных тканей и субклеточных фракций при осаждении 10 и 20% растворами ТХУ. Следовательно, в каждом конкретном случае необходимо определять количество РНК, экстрагируемое этанолом, и вводить соответствующую поправку. Для такого определения животным на 20—24 ч вводят меченый предшественник РНК (^{14}C -оротовая кислота или ^{14}C -уридин), а затем ткани и органы обрабатывают согласно предложенной схеме. Радиоактивность РНК определяют до и после экстракции этанолом и рассчитывают процент РНК, ушедшей с липидами. Если же ввести такую поправку не представляется возможным, то необходимо объединить радиоактивность фракции липидов и фракции РНК и судить только об их суммарной радиоактивности.

МЕТОД РАДИОАВТОГРАФИИ

И. Д. БЕЛЯЕВА

Метод радиоавтографии представляет собой способ регистрации радиоактивности, в основе которого лежит фотохимическая реакция. В последнее время в биохимических исследованиях радиоавтография все чаще становится естественным дополнением к другим методам обнаружения радиоактивности. Это объясняется следующим: во-первых, с помощью метода радиоавтографии можно точно локализовать включение предшественника, меченого радиоактивными изотопами, в совершенно определенные компоненты данной ткани, возможно наблюдение перемещения метки внутри тканевой системы; некоторые изотопы дают возможность локализовать включение метаболита в отдельные компоненты клетки — ядро или цитоплазму, ядрышки, отдельные хромосомы и даже определенные участки хромосом. Во-вторых, с помощью этого метода возможна регистрация включения такого незначительного количества радиоактивных элементов, которое не может быть обнаружено обычными физическими приборами. В-третьих, радиоавтография дает возможность обнаруживать включение меченого предшест-

венника в объекты микроскопических размеров и сравнивать интенсивность этих включений.

Радиоавтографический метод исследования регистрирует распад радиоактивных изотопов, введенных в ткани и клетки, с помощью специальных фотоэмульсий, называемых ядерными; последние отличаются от обычных фотоэмульсий меньшими размерами кристаллов бромида серебра и большей плотностью насыщения ими желатины. Во время контакта тканей и клеток с ядерной эмульсией (экспонирование) радиоактивные элементы, содержащиеся в клетках, вызывают в покрывающей их эмульсии, подобно лучам света, фотохимическую реакцию.

Суть этой реакции сводится к следующему: α - или β -частицы изотопов нарушают электростатическое равновесие в кристаллах бромида серебра эмульсии, в результате чего на поверхности последних происходит накопление ионов серебра, превращающихся в атомы восстановленного серебра. Эти образующиеся на протяжении экспонирования скопления металлического серебра называют скрытым изображением. В процессе проявления эмульсии в участках скрытого изображения (центры проявления) происходит ускоренное восстановление больших количеств ионов серебра, в результате чего образуются гранулы металлического серебра размером от долей микрометра до 1 микрометра, хорошо различимые в световом микроскопе в виде черных зерен.

В радиоавтографических исследованиях употребляют преимущественно изотопы, обладающие β -излучением (поток электронов), такие, как углерод (^{14}C), тритий (^3H), фосфор (^{32}P) и сера (^{35}S). При работе с этими изотопами надо учитывать особенности их периода полураспада и энергии β -частиц. У ^{14}C период полураспада равен 5700 годам, у ^3H — 12,4 года, у ^{35}S — 87,1 дня и у ^{32}P — 14,3 дня. Большой период полураспада ^{14}C и ^3H делает работу с этими изотопами очень удобной, так как на протяжении длительного периода времени обеспечивается практически постоянный уровень радиоактивности.

Энергия β -частиц определяет собой длину их пробега в ядерной эмульсии и тем самым разрешающую способность; чем короче пробег, тем выше разрешающая сила метода. Совокупность линейно расположенных зерен восстановленного серебра, фиксирующих путь каждой β -частицы в эмульсии, называют треком. Из указанных нами изотопов ^{32}P обладает максимальной энергией β -частиц,

которые в ядерной эмульсии распространяются на расстояние нескольких миллиметров. β -Частицы ^{35}S и ^{14}C обладают значительно меньшей энергией и проходят в эмульсии расстояние порядка 20 мкм. Наименьшей энергией обладают β -частицы трития, которые распространяются в эмульсии на расстояние 1 мкм, их треки могут быть представлены одним зерном металлического серебра.

Длительный период полураспада ^{14}C и ^3H , высокая разрешающая способность ^3H , а также то, что углерод и водород входят в состав всех органических соединений (их изотопами может быть помечено очень большое число метаболитов), сделали эти два изотопа наиболее удобными для применения. Именно их чаще всего используют в радиоавтографии.

Препараты тканей и клеток, в которых присутствие радиоактивного изотопа зарегистрировано в покрывающей их эмульсии в виде зерен восстановленного серебра, называют гисторадиоавтографами или просто автографами.

ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ АВТОГРАФА

I этап. Прежде всего в организм или культуральную среду вводят метаболит, содержащий радиоактивный изотоп, включение которого в состав определенной клеточной или тканевой структуры должно быть прослежено. Желательно, чтобы этот метаболит был достаточно специфическим предшественником, удельная радиоактивность вводимого предшественника была высока, а доза вводимой радиоактивности незначительна. Регистрация низких доз радиоактивности вполне возможна, поскольку допустимо длительное экспонирование, при котором имеет место суммирование излучаемых изотопом импульсов.

II этап. Спустя некоторый срок после введения изотопа, определяемый задачами исследования, кусочки тканей или мазки клеточных суспензий фиксируют. В качестве фиксатора для кусочков тканей чаще всего употребляют жидкость Карнуа (спирт:хлороформ:ледяная уксусная кислота — 6:3:1; длительность фиксации 2—3 ч), а для мазков клеточных суспензий — смесь спирта с ледяной уксусной кислотой (3:1; 10—15 мин). Кусочки тканей заливают в парафин и приготавливают из них срезы толщиной в 5—7 мкм.

III этап. Следующий этап представляет собой подготовку препаратов к покрытию ядерной эмульсией. Срезы тканей, наклеенные обычным способом на предметные стекла, тщательно освобождают от парафина, выдерживая в 2—3 порциях одного из растворителей — толуола, ксилола или бензола. После этого препараты проводят по спиртам нисходящей концентрации, ополаскивают несколькими порциями дистиллированной воды и высушивают. Не следует подготовку к покрытию эмульсией проводить заранее, за один и тем более за несколько дней, так как освобожденные от парафина срезы легко растрескиваются на воздухе.

IV этап. Все последующие процедуры, а именно покрытие препаратов ядерной эмульсией, их проявление и фиксирование выполняют в фотокомнате при фонаре с желто-зеленым фильтром № 117 или 118, но на максимально возможном расстоянии от фонаря.

В настоящее время для радиоавтографии с последующим анализом препаратов в световом микроскопе употребляют 2 типа ядерных эмульсий (Гос. НИИ Химфотопроект, Москва). Эмульсия типа М является мелкозернистой, а эмульсия типа Р — относительно крупнозернистой, размеры зерен восстановленного серебра в последней могут достигать 1 мкм. Выбор одной из этих эмульсий определяется задачами исследования. Если необходимо выявить включение меченого предшественника в отдельные структурные компоненты клетки, то, естественно, лучше употреблять эмульсию типа М.

Способы нанесения эмульсии на препараты довольно разнообразны, однако наиболее простым и быстрым является прием погружения препаратов в расплавленную эмульсию.

Расплавляют эмульсию в химическом стакане, который для этого погружают в термостатированную водяную баню (37—38 °С). Не следует допускать подогрева эмульсии до температуры выше 40 °С, так как в этом случае значительно увеличивается фон — количество зерен восстановленного без воздействия включенного радиоактивного изотопа серебра. Расплавленную эмульсию разбавляют подогретой до той же температуры дистиллированной водой, обычно 1:1. Препараты погружают в эмульсию, дают последней немного стечь, вытирают обратную сторону предметного стекла и укладывают их в горизонтальном положении для просушивания. Высы-

хает эмульсия при комнатной температуре за несколько (3—8) часов. Для экспонирования препараты складывают в специальные коробки, которые тщательно завертывают в черную бумагу. Изолированные таким образом от света препараты можно вынести из фотокомнаты. Экспонируют их обычно при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ (нижняя полка холодильника). Время экспонирования зависит, с одной стороны, от удельной радиоактивности включившегося предшественника и дозы введенной радиоактивности, а с другой — от чувствительности эмульсии, несколько варьирующей от партии к партии. Оптимальное время экспонирования определяют для каждого случая опытным путем, для чего покрывают эмульсией несколько дополнительных препаратов, проявляя их предварительно и отдельно от всех остальных. Фактически время экспонирования может составлять в разных случаях от нескольких дней до нескольких месяцев.

V этап. По окончании экспонирования препараты проявляют в амидоловом или метол-гидрохиноновом проявителе. В состав последнего входят: метол — 2 г, сульфит натрия безводный — 75 г (кристаллический — 150 г), гидрохинон — 8 г, карбонат натрия безводный — 40 г (кристаллический — 110 г), бромид калия — 5 г на 1 л воды. Перечисленные вещества растворяют последовательно в теплой ($40\text{—}50^{\circ}\text{C}$) дистиллированной воде. Этот основной раствор, который хранят в склянке с притертой пробкой в холодильнике, перед употреблением разводят дистиллированной водой в отношении 1:2. После проявления препараты споласкивают водой и фиксируют в 30% растворе тиосульфата натрия. Температура проявителя и фиксатора не должна превышать $18\text{—}20^{\circ}\text{C}$. Время проявления составляет 3—4 мин (при увеличении времени проявления значительно возрастает количество фоновых зерен), время фиксации в 1,5—2 раза должно превышать время проявления. После фиксирования препараты в течение 10—15 мин промывают проточной водой.

VI этап. Отмытые от тиосульфата натрия препараты можно сразу окрасить любыми гистологическими красителями. При окраске гематоксилинами следует избегать перекрашивания, так как на темно-синем фоне зерна серебра иногда бывают недостаточно хорошо видны. Окрашенные препараты проводят по спиртам восходящей концентрации, через карбол-ксилол, ксилол (2—3 порции) и заключают в бальзам. Следует достаточно долго

выдерживать препараты в абсолютном спирте (15—20 мин) и ксилоле (30—40 мин), что обеспечивает обезвоживание желатины эмульсии.

На этом приготовление радиоавтографа заканчивается, и его можно исследовать под микроскопом.

Полученный описанным нами способом автограф может быть использован для качественной регистрации присутствия радиоактивного элемента в клеточной структуре. С помощью такого автографа можно, например, ответить на вопрос, синтезировалась ли ДНК (включение ^3H -тимидина) данной клеткой в момент введения меченого предшественника или в какой из структур ядра (не преимущественно ли в ядрышке?) произошло подавление синтеза РНК (включение ^3H -уридина) при введении определенной дозы актиномина D, и ряд других вопросов (И. Д. Беляева, 1971, и др.).

Если же необходим количественный анализ результатов, то получение автографов требует соблюдения ряда дополнительных условий.

При сравнении интенсивности включения меченого предшественника в клеточные системы разных организмов или в клетки разных проб в опытах *in vitro* необходимо, чтобы во всех случаях употребляемый предшественник обладал одинаковой удельной активностью, вводили его в одинаковых дозах, а кусочки тканей и мазки клеточных суспензий фиксировали бы через одинаковый срок после введения радиоактивного изотопа. Все препараты следует покрывать одной эмульсией, экспонировать в одних и тех же условиях и проявлять одновременно. При сравнении интенсивности включения предшественника, меченого ^3H , одинаковая толщина срезов и покрывающей их эмульсии необязательна. В препаратах подсчитывают число зерен серебра на единицу площади определенной части клетки (ядра или цитоплазмы).

При количественном анализе включения предшественника, меченого ^{14}C или ^{35}S , одинаковая толщина срезов сравниваемых структур и покрывающей их эмульсии совершенно обязательна.

В этом случае подсчитывают число треков в толще эмульсии над клеткой.

Для более широкого ознакомления с методом радиоавтографии и его применением можно указать ряд пособий и статей (Н. Д. Грачева и др., 1960; А. А. Заварзин, 1965; О. И. Епифанова, В. В. Терских, 1969).

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Н. В. СМЕРНОВА

Основные белки ядра — гистоны — привлекают в настоящее время пристальное внимание в связи с предполагаемой важной биологической ролью, в частности участием их в регуляции активности генов. Поэтому возникла необходимость в разработке методов, позволяющих разделять суммарную фракцию гистонов на индивидуальные белки или хотя бы на более или менее однородные фракции. Один из таких методов описан ниже. В его основе лежит предложенный Джонсом метод фракционирования гистоновых белков вилочковой железы телят, известный теперь как метод Джонса II (Johns, 1964).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод дает возможность без предварительного выделения суммарных гистонов получать в относительно больших количествах 4 группы гистоновых белков: очень богатый лизином гистон F_1 , умеренно богатый лизином гистон $F_{2в}$, богатый аргинином гистон F_3 , — каждый из этих гистонов представляет собой индивидуальный белок (De Lange, Smith, 1971) — и гистоновую фракцию $F_{2а}$, которая является смесью двух белков. Фракция $F_{2а}$ может быть разделена на богатый аргинином гистон $F_{2а1}$ и богатый лизином гистон $F_{2а2}$ (Phillips, Johns, 1965).

Метод основан на избирательном осаждении отдельных фракций гистонов спиртом и разными объемами ацетона.

РЕАКТИВЫ

0,05 М трис-HCl буфер (pH 7,55), содержащий 0,25 М сахарозу, 0,025 М KCl, 0,01 М $MgCl_2$ (сокращенно TSS-буфер) для суспендирования выделенных ядер.

0,05 М Na-ацетатный буфер (pH 5,1), содержащий 0,14 М NaCl, — для извлечения глобулиновых белков.

80% этанол, 0,25 М по соляной кислоте (для приготовления смешивают абсолютный спирт и 1,25 М раствор HCl в объемном отношении 4:1) — для избирательной экстракции гистонов $F_3 + F_{2а}$.

Абсолютный этанол — для диализа.

0,25 М раствор HCl — для экстракции гистонов $F_1 + F_{2b}$.

Ацетон (квалификации х. ч. или ч. д. а.) — для осаждения гистонов F_1 , F_{2a} и F_{2b} .

ХОД ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

Метод выделения отдельных гистоновых белков был предложен для ткани вилочковой железы телят, отличающейся высоким содержанием ядер. Работая с тканью печени крыс, мы сочли полезным предварительно из гомогената клеток выделять ядра и затем уже из чистых ядер экстрагировать отдельные фракции гистонов. Для выделения ядер использовали метод Шово и соавторов (Chauveau e. a., 1956) в модификации, описанной Е. М. Кедровой и Л. В. Орловой (Е. М. Кедрова, Л. В. Орлова, 1968).

Ядра, выделенные из 10 г печени и проверенные под микроскопом на чистоту, суспендируют в 5 мл TSS-буфера (pH 7,55) и затем для извлечения глобулиновых белков гомогенизируют на холоду в течение 2 мин с 15 мл Na-ацетатного буфера (pH 5,1), содержащего 0,14 М хлорида натрия. Гомогенат центрифугируют при 6000 g 30 мин при 4°C. Эту процедуру повторяют еще два раза, но гомогенизируя уже по 30 с и центрифугируя по 15 мин. Надосадочную жидкость, представляющую собой глобулиновую фракцию, отбрасывают, а осадок, содержащий все гистоны, суспендируют в 12 мл 80% этанола, 0,25 М по соляной кислоте. Суспензию встряхивают при 4°C в течение 18 ч. По окончании экстракции суспензию центрифугируют на холоду в течение 20 мин при 6000—8000 g. Образующийся осадок еще дважды экстрагируют подобным же образом, но меньшим количеством раствора (6 мл) и по 3 ч. Объединенный после 3 экстракций центрифугат содержит гистоны F_3 и F_{2a} .

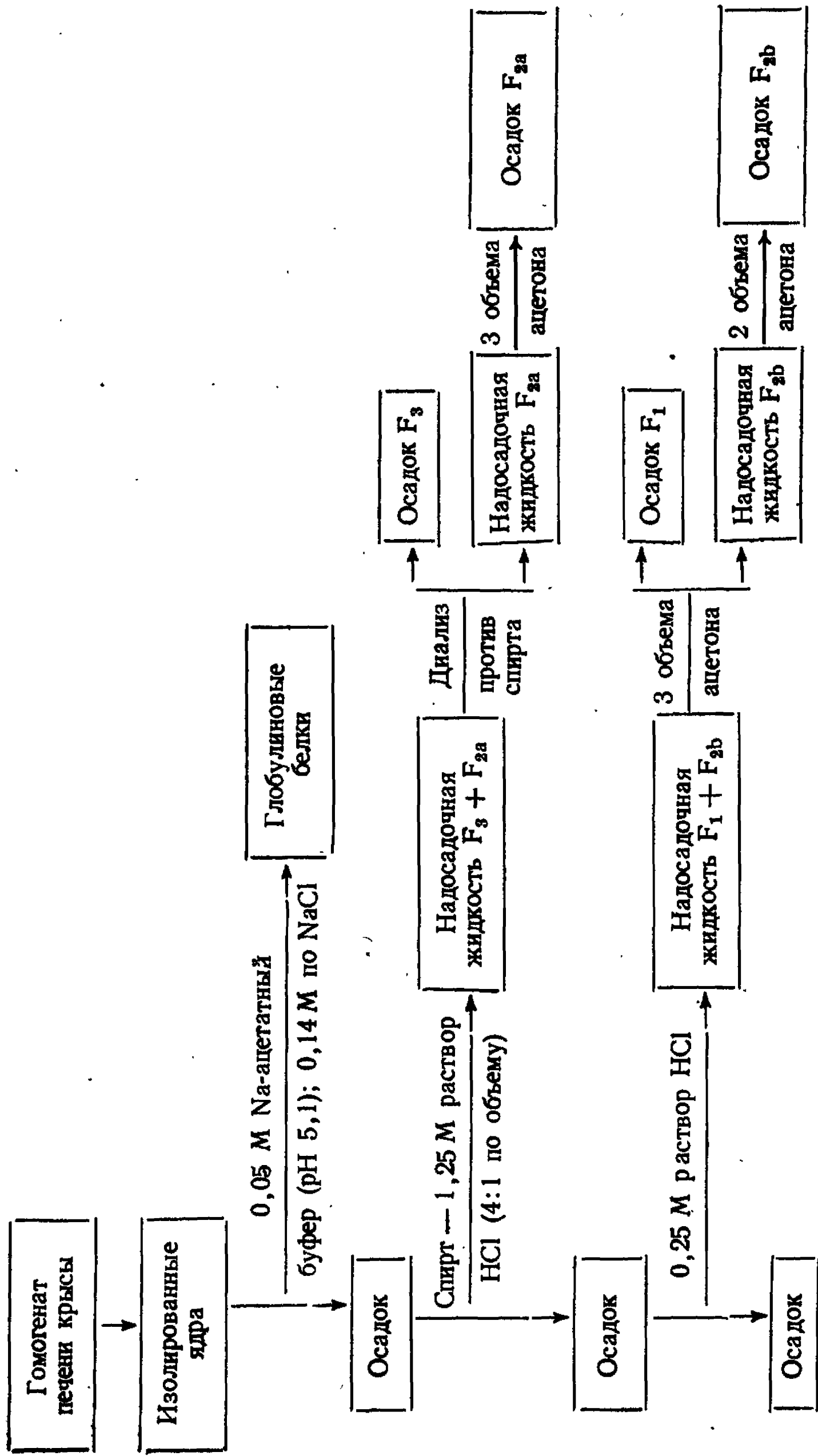
Для дальнейшего отделения этих белков друг от друга центрифугат после предварительного фильтрования диализируют против 500 мл этанола при 4°C в течение 22 ч, за этот срок дважды сменяя этанол на свежую порцию. Белые хлопья, выпадающие при диализе, представляют собой богатый аргинином гистон F_3 . Чтобы собрать эту фракцию, образовавшуюся при диализе, суспен-

зию центрифугируют 20 мин при 12 000 g. Гистон F_3 получают в осадке, который затем промывают один раз небольшим количеством спирта, дважды ацетоном и высушивают под вакуумом. Из 10 г сырой массы печени можно получить 5—6 мг этого белка, что составляет 20—23% от суммарного количества получаемых гистонов (24—25 мг). Надосадочная жидкость, остающаяся после удаления богатого аргинином гистона, содержит гистоновую фракцию F_{2a} , растворимую в спирте. Для ее осаждения к надосадочной жидкости при быстром помешивании добавляют 3 объема ацетона и центрифугируют при 12 000 g в течение 30 мин (желательно в закрытых пробирках, чтобы предотвратить испарение ацетона). Осадок еще дважды промывают ацетоном и высушивают под вакуумом. Выход фракции F_{2a} составляет 8,5—8,7 мг, что соответствует 35% общего количества выделяемых из 10 г печени гистонов.

Осадок, остающийся после экстракции фракций F_3 и F_{2a} 80% спиртом, 0,25 M по соляной кислоте, содержит два гистоновых белка F_{2b} и F_1 . Этот осадок экстрагируют в 15 мл 0,25 M раствора HCl в течение 4 ч при встряхивании на холоду; после центрифугирования осадок экстрагируют еще раз в течение 1 ч 5 мл того же раствора. Полученную после центрифугирования надосадочную жидкость объединяют, фильтруют и оставляют на 15 мин при комнатной температуре, затем при быстром помешивании к ней добавляют 3 объема ацетона и центрифугируют 30 мин в закрытых пробирках при 9000—10 000 g. Образующийся осадок еще 3 раза промывают в ацетоне и высушивают. Этот осадок представляет собой очень богатый лизином гистон F_1 . Его выход составляет 4,3—4,5 мг, т. е. 16—18% общего количества получаемых гистонов.

Надосадочная жидкость, остающаяся после осаждения очень богатого лизином гистона, содержит умеренно богатый лизином гистон F_{2b} . Его осаждают путем добавления при энергичном помешивании 2 объемов ацетона и центрифугирования в закрытых пробирках в течение 30 мин при 12 000 g. Осадок еще дважды промывают ацетоном и сушат под вакуумом. Выход гистона F_{2b} 6 мг, что соответствует 24% суммарного количества гистоновых белков.

Ниже представлена схема фракционирования гистонов печени крыс (схема VIII).



БЕСКЛЕТОЧНАЯ МИКРОСОМНАЯ СИСТЕМА БИОСИНТЕЗА КОЛЛАГЕНА И ДРУГИХ БЕЛКОВ

А. Е. БЕРМАН

Для изучения механизмов трансляции в процессе белкового синтеза, а также различных факторов, влияющих на этот процесс, широкое распространение получили бесклеточные системы биосинтеза белков. Ниже описан метод изучения синтеза коллагена и других белков в бесклеточной микросомной системе из куриных эмбрионов, который может быть использован также для исследования биосинтеза белков, образующихся в других тканях животных. Метод представляет собой модификацию ранее описанных методов (Hoagland e. a., 1958; Sauer, Bugrow, 1972).

РЕАКТИВЫ И РАСТВОРЫ

Используют реактивы квалификации о. с. ч. или х. ч. (реактивы другой квалификации предварительно перекристаллизовывают). Немеченые и меченые аминокислоты используют в L-форме, а при наличии рацематов концентрацию растворов аминокислот увеличивают в 2 раза. Препараты меченых аминокислот должны иметь удельную радиоактивность не ниже 100 кюри/моль для ^{14}C -аминокислот и 1000—10 000 кюри/моль для ^3H -аминокислот. Реактивы, применяемые для приготовления сцинтилляционной жидкости, должны иметь квалификацию о. с. ч. или «сцинтилляционный».

Все растворы готовят на бидистиллированной воде и хранят при 2—4°C или в замороженном состоянии.

1 М раствор трис-HCl (pH 7,6). 2,5 М раствор KCl; 0,5 М раствор ацетата или хлорида магния.

Раствор 19 немеченых аминокислот ($1 \cdot 10^{-6}$ М каждой аминокислоты), раствор не содержит аминокислоты, аналогичной меченой; хранят в фасовках по 1—2 мл при —20°C в течение года.

10 мМ раствор динатриевой соли АТФ нейтрализуют 1 М раствором КОН и хранят при —20°C в течение 2 нед.

2 мМ раствор ГТФ хранят при —20°C в течение 2 нед.

0,1 М раствор креатинфосфата, хранят при -20°C в течение 2 нед.

Раствор креатинфосфокиназы (4 мг/мл), готовят в день постановки опыта с бесклеточной системой.

1 М раствор 2-меркаптоэтанола.

Раствор меченой аминокислоты (200 мкКи/мл), хранят в стерильных условиях при -20°C .

1 М раствор уксусной кислоты.

5% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), содержащий 0,1% немеченой аминокислоты, аналогичной меченой.

8 М раствор мочевины, содержащий 2 М NaCl.

Растворы для определения белка по Лоури.

Сцинтилляционная жидкость: 15 г 2,5-дифенилоксазола (ППО) и 50 мг 1,4-ди(5-фенил)-оксазолил-бензола (ПОПОП) растворяют в 1 л толуола.

Кроме указанных растворов, за 1—2 дня до начала опыта готовят буферные растворы.

Буфер А — 0,25 М сахароза, 0,1 М KCl, 5 мМ соль магния (хлорид или ацетат), 0,025 М трис-HCl (pH 7,6).

Буфер Б — 0,1 М KCl, 5 мМ соль магния, 0,025 М трис-HCl (pH 7,6).

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРОСОМ И ТОТАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ФАКТОРОВ ТРАНСЛЯЦИИ

Все препаративные работы, за исключением специально оговоренных случаев, проводят при $2-4^{\circ}\text{C}$, используя рефрижераторные центрифуги.

20—30 г ткани куриных эмбрионов гомогенизируют порциями по 5—7 г в 2,5 объема (г/мл) буфера А в стеклянном цилиндрическом гомогенизаторе с тефлоновым пестиком, который вращается мотором со скоростью 1500 об/мин. Гомогенат фильтруют через два слоя марли, а фильтрат центрифугируют при 12000 g в течение 15 мин, при этом осаждаются ядра и митохондрии. Отсасывают $3/4$ надосадочной жидкости и центрифугируют ее при 105000 g в течение часа. Осадок (S 105-осадок) содержит микросомы. Надосадочную жидкость (S 105-надосадочная жидкость) отсасывают и используют для получения факторов трансляции. Для этого ее разводят в 3 раза холодной бидистиллированной водой и, добавляя по каплям 1 М раствор уксусной кислоты при интенсивном перемешивании, устанавливают pH 5,1—5,2. Выпав-

ший осадок (рН 5-фракция), содержащий белковые факторы трансляции, тРНК, аминоксил-тРНК-синтетазы, собирают центрифугированием при 12 000 g в течение 15 мин, растворяют в 4—5 мл буфера Б и, добавляя по каплям 1 М раствор КОН, устанавливают рН 7,6. Раствор просветляют центрифугированием при 12 000 g в течение 5 мин, надосадочную жидкость отсасывают, отбирают из нее 0,1 мл для определения белка и хранят при -20°C до одной недели.

S 105-осадок осторожно споласкивают буфером Б и суспендируют в 4—5 мл того же буфера с помощью гомогенизатора. Из суспензии отбирают 0,1 мл для определения белка и хранят при -20°C 2—3 дня.

БЕСКЛЕТОЧНАЯ СИСТЕМА БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА

Бесклеточная система в расчете на конечный объем, равный 1 мл, содержит следующие компоненты:

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Микросомы (S 105-осадок) | — 1—2 мг (по белку) |
| 2. рН 5-фракция | — 2—4 мг (по белку) |
| 3. Трис-НСl (рН 7,6) | — 25 мкмоль |
| 4. КСl | — 100 мкмоль |
| 5. Соль магния (ацетат или хлорид) | — 5 мкмоль |
| 6. Смесь 19 немеченых аминокислот | — 0,05 мкмоль каждой аминокислоты |
| 7. АТФ | — 1 мкмоль |
| 8. ГТФ | — 0,2 мкмоль |
| 9. Креатинфосфат | — 10 мкмоль |
| 10. Креатинфосфокиназа | — 0,4 мг |
| 11. 2-Меркаптоэтанол | — 6 мкмоль |
| 12. Меченая аминокислота | — 0,5 мкКи |

В зависимости от целей эксперимента конечный объем проб может варьировать от 50—100 мкл до 5—10 мл. Ниже приведен пример составления бесклеточной системы, рассчитанной на 10 проб с конечным объемом каждой пробы, равным 1 мл (табл. 30).

Готовят (в ледяной бане) смесь компонентов, как указано в табл. 30. Объем смеси доводят водой до 7 мл.

Количество добавляемых трис-буфера, растворов КСl и соли магния рассчитано таким образом, что концентрация буфера, а также одно- и двухвалентных катионов в смеси соответствует их концентрациям в растворах

Таблица 30

**Приготовление смеси компонентов для бесклеточной
системы биосинтеза белка**

Компонент	Концентрация исходного раствора (М)	Количество, добавляемое в смесь (мл)
Трис-НСI (рН 7,6)	1,0	0,35
KCl	2,5	0,28
Соль магния (ацетат или хлорид)	0,5	0,07
Смесь 19 немеченых аминокислот	$1 \cdot 10^{-6}$ каждой	0,5
АТФ	$1 \cdot 10^{-2}$	1,0
ГТФ	$2 \cdot 10^{-3}$	1,0
Креатинфосфат	0,1	1,0
Креатинфосфокиназа	4 мг/мл	1,0
2-Меркаптоэтанол	1,0	0,06
Меченая аминокислота	200 мкКи/мл	0,03

рН 5-фракции и микросом. Следовательно, дальнейшее добавление последних к смеси не изменит ее ионный состав.

В 10 пробирок разливают по 0,7 мл смеси компонентов и по 0,2 мл раствора рН 5-фракции. В каждую пробирку доливают по 0,1 мл суспензии микросом. При указанных выше соотношениях навески ткани и буфера гомогенизации (буфер А), а также конечных объемах раствора рН 5-фракции и суспензии микросом каждая проба содержит 1—2 мг микросом (по белку) и 2—4 мг рН 5-фракции (по белку). После тщательного перемешивания 8 проб инкубируют в термостатированной бане при 37 °С в течение 40 мин. 2 пробы (контроль на адсорбцию радиоактивности) оставляют на 40 мин в ледяной бане. После инкубации пробы охлаждают в ледяной бане.

Для определения включившейся в белки радиоактивности из контрольных и опытных проб отбирают по 0,1 мл и приливают к ним по 2 мл 5% раствора ТХУ, содержащего 0,1% немеченой аминокислоты, аналогичной меченой. Центрифугируют и осадки промывают тем же раствором ТХУ. Затем осадки суспендируют в 3 мл 5% раствора ТХУ и прогревают на водяной бане при

90°C в течение 20 мин, при этом происходит гидролиз аминоксил-тРНК. Суспензию охлаждают и фильтруют через миллипоровые фильтры с диаметром пор 0,7—1,5 мкм (Rufs, Aufs, Чехословакия). Фильтры промывают несколько раз 10 мл 5% раствора ТХУ, 5 мл спирта и высушивают. Затем фильтры помещают во флаконы сцинтилляционного счетчика, содержащие 10 мл сцинтилляционной жидкости, и измеряют радиоактивность. Систему можно считать эффективной, если количество включившейся в белки (не растворимой в горячей ТХУ) радиоактивности на 2—3 порядка превышает количество адсорбированной радиоактивности.

Помимо определения эффективности белкового синтеза в бесклеточной системе по включившейся в белки радиоактивности, часто возникает необходимость в анализе синтезированных радиоактивных белков. Для проведения такого анализа синтезированные белки необходимо выделить из системы и отделить от нерадиоактивных белков. С этой целью мы применили обработку системы после инкубации концентрированным раствором мочевины при высокой ионной силе (А. Е. Берман и др., 1972).

К системе, оставшейся после отбора проб для определения радиоактивности, добавляют 3 объема 8 М раствора мочевины, содержащей 2 М NaCl. Смесь оставляют в холодильнике на 2—3 дня, после чего агрегированный материал осаждают центрифугированием при 105 000 g в течение часа и отбрасывают. Надосадочную жидкость прогревают в водяной бане при 90°C в течение 20 мин, затем охлаждают и диализуют в течение ночи против проточной водопроводной воды и 4 ч против дистиллированной воды. Диализат центрифугируют при 105 000 g в течение часа и собирают прозрачную надосадочную жидкость, которая содержит экстрагированные радиоактивные белки. Указанная обработка позволяет выделить до 40% синтезированных в системе полипептидов, осаждаемых ТХУ.

При изучении биосинтеза коллагена в бесклеточной системе из куриных эмбрионов нами было показано, что выделенный из системы с помощью этой обработки радиоактивный материал расщепляется высокоочищенной коллагеназой и может служить субстратом для коллагеновой пролин-гидроксилазы. Это доказывает, что применяемая обработка позволяет выделять синтезированные в системе индивидуальные белки.

БЕСКЛЕТОЧНАЯ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩАЯ СИСТЕМА ИЗ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ КРЕБС-2

Т. Ю. УГАРОВА

Для трансляции экзогенных мРНК, т. е. для синтеза белка на внесенных мРНК, широко используют экстракты из клеток асцитной карциномы Кребс-2. Эта система обладает рядом достоинств:

1) после преинкубации экстракты из клеток Кребс-2 имеют низкое эндогенное включение, что облегчает анализ продуктов синтеза;

2) система может быть использована для трансляции многих, если не всех мРНК эукариотов и вирусов животных. В настоящее время показано, что система активно транслирует РНК вируса энцефаломиокардита, глобиновые мРНК различного происхождения, мРНК белка хрусталика глаза, мРНК легкой цепи иммуноглобулина, смесь мРНК из цитоплазмы гомологичных клеток, гистоновые мРНК.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ

Компоненты белоксинтезирующего аппарата (рибосомы, белковые факторы трансляции, тРНК и аминокил-тРНК-синтетазы) вносят в систему в виде фракции, получаемой путем центрифугирования гомогената клеток Кребс-2 при 30 000 g (фракция S_{30}). Концентрация фракции S_{30} в системе составляет 10—20 единиц оптической плотности при 260 нм на 1 мл ($A_{260}/\text{мл}$).

Реакционная смесь содержит также 30 мМ трис-НСI (рН 7,6), 3,5 мМ MgCl_2 , 85 мМ KCl, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 1,5 мМ АТФ, 0,1 мМ ГТФ, 0,6 мМ ЦТФ, 10 мМ креатинфосфат, 0,02 мг/мл креатинкиназы, по 40 мкМ каждой из немеченых аминокислот (включая глютамин и аспарагин) и 3 мкМ меченую аминокислоту с высокой удельной активностью. 2-Меркаптоэтанол и ЦТФ не являются обязательными. По нашим данным, присутствие 2-меркаптоэтанола при выделении и функционировании бесклеточных экстрактов не влияет на уровень синтеза. ЦТФ редко включают в состав бесклеточных белоксинтезирующих систем, однако его присутствие существенно в

длительно функционирующих системах для обеспечения процесса регенерации ЦЦА-конца тРНК (Aviv e. a., 1971).

Стимуляция включения радиоактивной метки зависит от количества добавленной мРНК. Для препаратов мРНК, хорошо очищенных от рибосомных РНК, заметная стимуляция наблюдается при концентрациях 5—10 мкг/мл, а зона оптимальных концентраций (20—40 мкг/мл) может несколько варьировать в зависимости от относительной молекулярной массы мРНК.

Эффективность трансляции экзогенных мРНК возрастает при добавлении в систему асцитной тРНК и белковых факторов промывки рибосом ретикулоцитов. Транспортные РНК выделяют по методу Эренштейна (Ehrenstein, 1968) и вносят в систему в количестве 100—200 мкг/мл. Факторы промывки ретикулоцитных рибосом выделяют по прописям, приведенным разными авторами (Shafritz, Anderson, 1970; Metafora e. a., 1972), и добавляют в систему в количестве 3—5 единиц A_{280} /мл.

При выборе меченой аминокислоты исходят из аминокислотного состава синтезируемого белка.

ТРЕБОВАНИЯ К РЕАКТИВАМ

Реактивы не должны содержать примесей солей тяжелых металлов. NaCl, KCl и HCl желательно использовать квалификации о. с. ч. Трис(оксиметиламинометан) можно использовать перекристаллизованный производящей фирмой (например, трижды перекристаллизованный трис фирмы «NBC», Англия) или перекристаллизовывать трис из перегнанного этанола. Для этого 200 г триса растворяют при нагревании на водяной бане в 2 л этанола и фильтруют через воронку для горячего фильтрования. Раствор охлаждают во льду, кристаллы собирают на воронке Бюхнера и подсушивают в вакуум-эксикаторе.

Трудности возникают с препаратами магния, так как в продаже нет отечественных препаратов с высокой степенью чистоты. Соли магния необходимо перекристаллизовывать или, во всяком случае, проверять выбранный препарат. 2-Меркаптоэтанол перегоняют в вакууме и хранят в ампулах под азотом.

Препараты АТФ, ГТФ и ЦТФ можно использовать как фирмы «Reanal» (Венгрия), так и западных фирм,

например «Calbiochem» (США) или «Serva» (ФРГ). Уровень включения метки в системе зависит в значительной степени от качества препарата АТФ. Следует обратить внимание и на правильное хранение трифосфатов—при температуре ниже 0°C и без доступа влаги. Хорошо сохраняются препараты при -20°C в плотно закрытых флаконах, помещенных в полиэтиленовые мешки с силикагелем.

Продажные препараты креатинфосфата и креатинкиназы (фирма «Reanal») менее надежны. Нам встречались серии креатинфосфата со значительными примесями креатина и креатинина (такой препарат при растворении опалесцирует) и полностью неактивные серии креатинкиназы. Каждый новый препарат должен быть проверен в системе. Хранить креатинфосфат следует при 4°C , а креатинкиназу при -20°C , оберегая оба препарата от проникновения влаги.

Немеченые аминокислоты лучше использовать в L-форме и высокой степени чистоты (A-grade). Важно предохранять аминокислоты от перекрестного загрязнения, так как в конечном итоге это может привести к разбавлению метки. Следует также иметь гидролизат белка или дешевые аминокислоты, аналогичные меченым, для отмывки проб.

Меченые аминокислоты должны отвечать следующим требованиям:

- 1) иметь высокую удельную активность — 200—400 Ки/моль для ^{14}C -аминокислот и на 1—2 порядка выше для ^3H -аминокислот;
- 2) быть стерильными;
- 3) не содержать кислотонерастворимой метки.

Этим требованиям отвечают аминокислоты фирмы «Amersham» (Англия). Можно использовать и чехословацкие препараты с более низкой удельной активностью, однако в последнем случае лучше работать со смесью нескольких (2—4) аминокислот.

БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

Все растворы готовят на деионизированной или трижды дистиллированной воде и фильтруют через стеклянные фильтры. Посуда и фильтры должны быть стерилизованы перед употреблением.

Для приготовления буферов используют 3 исходных раствора.

1 М раствор трис-НСl, рН 7,6 (121,1 г триса на 1 л); рН раствора устанавливают, добавляя 1 М НСl. Окончательное доведение рН раствора осуществляют на другой день после приготовления.

2 М раствор КСl (149 г на 1 л).

1 М раствор MgCl₂. Хлорид магния содержит непостоянное количество воды, поэтому раствор готовят по плотности. Плотность 1 М раствора равна 1,0717 при температуре 20 °С.

Можно использовать также 1 М раствор ацетата магния (214 г Mg(CH₃COO)₂·4H₂O на 1 л).

Буфер А — 35 мМ трис-НСl (рН 7,6) и 140 мМ NaCl. Применяют для отмывки клеток. Готовят раствор 10-кратной концентрации и перед использованием разводят охлажденной водой в 10 раз. Для приготовления раствора 10-кратной концентрации берут 81,9 г NaCl и 350 мл 1 М раствора трис-НСl (рН 7,6).

Буфер Б — 10 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl₂. Используют для осмотического шока клеток. Для приготовления 100 мл буфера 10-кратной концентрации берут 10 мл 1 М трис-НСl (рН 7,6), 5 мл 2 М КСl и 1,5 мл 1 М MgCl₂. Перед использованием разводят в 10 раз охлажденной водой.

Буфер В. Добавляют к гомогенату клеток в количестве $\frac{1}{9}$ от объема гомогената для установления конечных концентраций: 30 мМ трис-НСl (рН 7,6), 125 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂ и 7 мМ 2-меркаптоэтанола. Буфер готовят с учетом концентрации солей в растворе для осмотического шока. Для приготовления 100 мл буфера берут 21 мл 1 М трис-НСl (рН 7,6), 58 мл 2 М КСl и 3,75 мл 1 М MgCl₂. Перед использованием добавляют 50 мкл 15 М 2-меркаптоэтанола на 10 мл буфера.

Буфер Г — 30 мМ трис-НСl (рН 7,6), 85 мМ КСl, 3,5 мМ MgCl₂ и 7 мМ 2-меркаптоэтанол. Используют при пропускании экстракта через колонку с сефадексом. Для приготовления 100 мл раствора 10-кратной концентрации берут 30 мл 1 М трис-НСl (рН 7,6), 42,5 мл 2 М КСl и 3,5 мл 1 М MgCl₂. Перед использованием разводят охлажденной водой в 10 раз и добавляют 0,5 мл 15 М меркаптоэтанола на 1 л рабочего раствора. Буфер 10-кратной концентрации используют как солевую смесь для бесклеточной системы.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ ДЛЯ БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЫ

Трифосфаты, компоненты АТФ-регенерирующей системы, немеченые аминокислоты и соли вносят в пробы в виде смеси в объеме 15 мкл. Ниже приведены прописи для приготовления отдельных исходных растворов и для составления смесей из этих растворов (табл. 31). Если используемые препараты отличаются от приведенных ниже по величинам относительных молекулярных масс, производят пересчет. Готовят несколько исходных растворов аминокислот, сортируя аминокислоты по их растворимости в воде и стабильности.

Из исходных растворов готовят смеси реактивов для бесклеточной системы.

Смесь I — для инкубации проб с меченой аминокислотой — не содержит аминокислоты, аналогичной меченой (лизина), имеет в своем составе буфер и соли. В табл. 32 дано приготовление смеси на 100 проб, объемом по 0,1 мл.

Смесь II — для преинкубации фракции S_{30} — содержит полный набор немеченых аминокислот, не имеет в своем составе солей. В табл. 32 дан способ приготовления смеси для преинкубации 10 мл фракции S_{30} .

Наименее стабильный компонент смеси — креатинкиназа. Последнюю и 2-меркаптоэтанол желательно добавлять в день опыта. Смесь остальных реактивов может храниться при -20°C в течение нескольких недель.

ПОЛУЧЕНИЕ АСЦИТНЫХ КЛЕТОК

Культуру асцитных клеток карциномы Кребс-2 поддерживают пассажами на белых беспородных мышаксамках с массой тела около 20 г. Животным вводят внутрибрюшинно по 0,2—0,25 мл свежесобранной асцитной жидкости. Клетки собирают на 6—7-й день после перевивки. Для этого мышь забивают смещением шейных позвонков, шерсть на брюшке протирают 70% этанолом, надрезают и отводят в сторону кожу, брюшину протыкают, не повреждая по возможности сосудов, и асцитную жидкость сливают в центрифужные стаканы, наполовину заполненные охлажденным буфером А. При нормальном развитии опухоли от каждой мыши можно получить по 5—10 мл асцитной жидкости, содержащей

Таблица 31

Приготовление и хранение реактивов

№ раствора	Компоненты	Относительная молекулярная масса	Навеска, мг	Объем растворителя	Примечание
1	АТФ, двунатриевая соль	623	93,4	0,5 мл H ₂ O	Раствор нейтрализуют КОН по универсальной индикаторной бумаге, хранят при —20 °С
2	ГТФ, трилитиевая соль · 5H ₂ O	631	6,3	0,5 мл H ₂ O	Хранят при —20 °С
3	ЦТФ, натриевая соль · 2H ₂ O	563	34,0	0,5 мл H ₂ O	То же
4	Креатинфосфат · 6H ₂ O	363	181,2	1,0 мл H ₂ O	То же
5	Креатинкиназа	—	2,0	0,5 мл H ₂ O	Раствор не подлежит хранению
6	L-глутамин	162	3,2	2,0 мл H ₂ O	Хранят при —20 °С в мелких фасовках, повторно не замораживают
7	L-тирозин	181	3,6	4,0 мл 0,1 М раствора HCl	Растворяют при нагревании, хранят при 4 °С, перед внесением в смесь нейтрализуют КОН
8	Смесь 17 аминокислот: глицин L-аланин L-серин L-валин L-лейцин L-изолейцин L-метионин L-пролин L-треонин L-фенилаланин L-триптофан L-аргинин · HCl L-гистидин · HCl · H ₂ O L-глутаминовая кислота	75 89 105 117 131 131 149 115 119 165 204 211 210 147	3,0 3,6 4,2 4,7 5,2 5,2 5,9 4,6 4,8 6,6 8,2 8,4 8,4 5,9	20 мл H ₂ O	Смесь не содержит лизина (предназначена для работы с меченым лизином). В случае использования другой меченой аминокислоты лизин вводят в состав смеси (навеска 7,3 мг), а аминокислоту, аналогичную меченой, исключают из состава раствора. Фасовки по 1—2 мл хранят при —20 °С в течение года

№ раствора	Компоненты	Относительная молекулярная масса	Навеска, мг	Объем растворителя	Примечание
9	L-аспарагиновая кислота	133	5,3	20 мл H ₂ O	Фасовки по 1—2 мл хранят при —20 °С в течение года
	L-аспарагин · H ₂ O	150	6,0		
	L-цистеин	157	6,2		
	Смесь содержит 18 аминокислот: те же 17, что в растворе 8, и дополнительно L-лизин · HCl	183	7,3		

Таблица 32

Приготовление смесей реактивов для бесклеточной системы биосинтеза белка

Раствор	Объем раствора (мл), вносимого в	
	смесь I	смесь II
1 (АТФ)	0,05	0,05
2 (ГТФ)	0,05	0,05
3 (ЦТФ)	0,05	0,05
4 (креатинфосфат)	0,20	0,20
5 (креатинкиназа)	0,05	0,05
Буфер Г	0,7	—
10-кратной концентрации		
6 (глутамин)	0,04	0,04
7 (тирозин)	0,08	0,08
8 (смесь 17 аминокислот)	0,2	—
9 (смесь 18 аминокислот)	—	0,2
1,5 М 2-меркаптоэтанол	0,04	—
Вода	0,04	—
Общий объем смеси	1,5	0,72

около $1 \cdot 10^8$ клеток/мл. Для опыта достаточно клеток, полученных от 3—4 мышей.

Асцитную жидкость не используют, если она содержит кровь или сгустки отмерших клеток.

ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИИ S_{30}

В дальнейшем все операции, кроме оговоренных особо, проводят на холоду. Собранные клетки осаждают центрифугированием при 2000 g в течение 5 мин и дважды промывают буфером А центрифугированием при том же режиме. Затем клетки суспендируют в небольшом объеме (20—40 мл) буфера А, переносят в стаканы с узким коническим дном и центрифугируют при 6000 g 10 мин. Надосадочную жидкость отсасывают, а к плотному осадку клеток добавляют 2 объема гипотонического буфера (буфер Б). Клетки тщательно перемешивают и оставляют для набухания на 10 мин. Необходимо следить за ходом набухания, просматривая клетки в фазово-контрастном микроскопе. Набухшие клетки разрушают механически в стеклянном гомогенизаторе Даунса 5—15 ходами пестика. Разрушение также контролируют под микроскопом: должно быть разрушено не менее 50% клеток. Добавляя буфер В ($1/9$ объема гомогената), гомогенат доводят до конечных концентраций: 30 мМ трис-НСl (рН 7,5), 125 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$ и 7 мМ 2-меркаптоэтанол. Центрифугируют 10 мин при 30 000 g (High speed 18, ротор 8×50 , 16 000 об/мин). Надосадочную жидкость (фракцию S_{30}) собирают, удаляя по возможности верхний жировой слой.

ПРЕИНКУБАЦИЯ ФРАКЦИИ S_{30}

Преинкубацию экстракта проводят в присутствии полного набора немеченых аминокислот, АТФ, ГТФ, ЦТФ и АТФ-регенерирующей системы. Конечные концентрации перечисленных компонентов те же самые, что в инкубационной смеси (см. раздел «Общая характеристика системы»). К фракции S_{30} добавляют смесь II из расчета 0,072 мл смеси на каждый миллилитр экстракта и инкубируют 50 мин при 37 °С. Обычно преинкубируют 2—3 мл экстракта. Этот объем удобен для пропускания через колонку с сефадексом и достаточен для постановки опыта с 50—70 пробами.

Преинкубированную фракцию S_{30} охлаждают в ледяной бане и центрифугируют 10 мин при 30 000 g. Надосадочную жидкость осторожно сливают с осадка.

ПРОПУСКАНИЕ ФРАКЦИИ S_{30} ЧЕРЕЗ КОЛОНКУ С СЕФАДЕКСОМ

Для удаления аминокислот и смены буферного раствора необходимо пропускание фракции S_{30} через колонку, содержащую сефадекс G-25 (грубый). Колонку заполняют сефадексом и хранят под тридистиллированной водой, а перед нанесением препарата уравнивают буфером Г. Объем геля сефадекса в колонке должен в 7—10 раз превышать объем пропускаемого экстракта. Препарат наносят и собирают при малой скорости протекания (6—8 капель в 1 мин). Обычно нужную фракцию находят по мутности элюата, однако необходимо знать свободный объем колонки, так как в ряде случаев после преинкубации экстракт становится почти прозрачным, и тогда сбор фракции производят по объему. Первые капли препарата, сильно разбавленные буфером, отбрасывают, а собирают среднюю концентрированную часть препарата (1,5—2,0 мл).

Для оценки концентрации экстракта к 30 мкл собранной фракции добавляют 3 мл воды и измеряют поглощение на спектрофотометре при 260 нм. Концентрации экстрактов обычно колеблются в диапазоне 30—60 единиц A_{260} /мл. Экстракт можно хранить при -70°C . При отсутствии холодильника на -70°C экстракты используют в день выделения.

СОСТАВ ПРОБ И УСЛОВИЯ ИНКУБАЦИИ

Пробы объемом 0,1 мл содержат по 15 мкл смеси I, по 30 мкл преинкубированной фракции S_{30} , пропущенной через колонку с сефадексом, и по 20 мкл меченой аминокислоты. Если в пробы не вносят РНК или других дополнительных компонентов, то до объема 0,1 мл добавляют 35 мкл тридистиллированной воды. Объем всех вносимых добавок не должен превышать 35 мкл и они не должны содержать солей. Порядок добавления компонентов системы в пробу следующий: смесь реактивов, рассчитанное количество H_2O , фракция S_{30} , мРНК, меченая аминокислота. Другие добавки (тРНК или факторы про-

мывания ретикулоцитных рибосом) вносят перед добавлением мРНК. Для каждого варианта опыта ставят по две параллельные пробы. Перед инкубацией пробы тщательно перемешивают. Пробы инкубируют при 37 °С 60 или 90 мин. Чтобы избежать изменения объема проб за счет испарения, инкубацию ведут в плотно закрытом термостате, внутреннее пространство которого насыщено водяным паром. Две контрольные пробы на неспецифическую адсорбцию метки, содержащие полную систему, инкубируют при 0 °С.

ОСТАНОВКА РЕАКЦИИ И ОБРАБОТКА ПРОБ

Реакцию останавливают добавлением 0,2 мл 0,1 М раствора КОН, содержащего 0,1 % немеченой аминокислоты, аналогичной меченой, и пробы инкубируют еще 20 мин при 37 °С для гидролиза аминоксил-тРНК. На этом этапе пробы можно оставить на ночь в холодильнике. Затем к пробам добавляют по 2 мл охлажденного 10% раствора ТХУ, содержащего 0,1 % немеченой аминокислоты, пробы выдерживают на холоду 10 мин и наносят на миллипоровые фильтры (Rufs, Чехословакия), предварительно смоченные ТХУ с 0,1 % немеченой аминокислотой. Пробирки 3 раза промывают 5% раствором ТХУ по 4 мл каждый раз, затем фильтр промывают 10 мл 5% раствора ТХУ и 5 мл этанола. Радиоактивность кислотонерастворимого осадка на фильтрах измеряют в толуоловом сцинтилляторе на сцинтилляционном счетчике.

ОТРАБОТКА МЕТОДА

При налаживании метода первый опыт полезно поставить с непреинкубированной фракцией S_{30} . Высокий уровень эндогенного включения будет свидетельствовать о правильном приготовлении экстракта и хорошем качестве реактивов. Систему можно считать работающей, если включившаяся в белки радиоактивность в опытных пробах окажется на 1—2 порядка выше радиоактивности контрольных проб (на неспецифическую адсорбцию метки).

Активность преинкубированной фракции, т. е. ее способность транслировать экзогенные матрицы, можно проверить по синтезу меченого полифенилаланина после добавления поли(У). Конечные концентрации солей в си-

стеме при трансляции поли(У) доводят до 125 мМ КСl и 7,5 мМ MgCl₂.

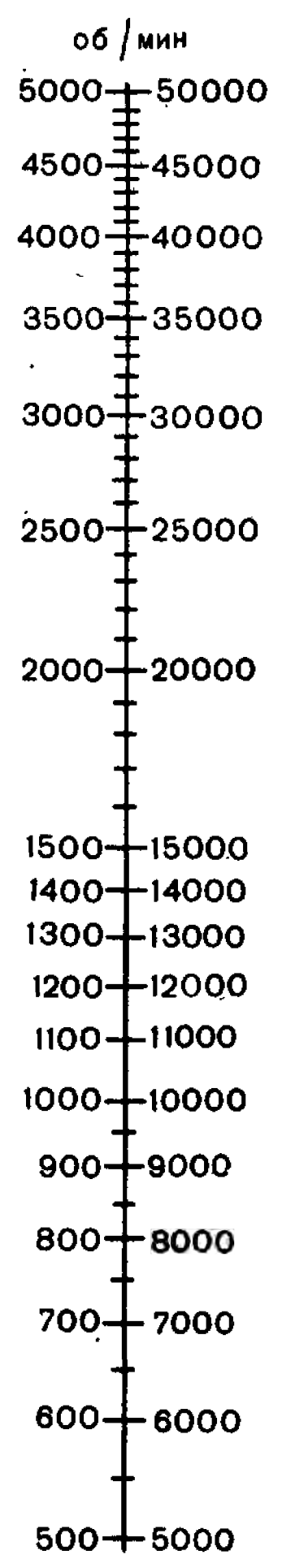
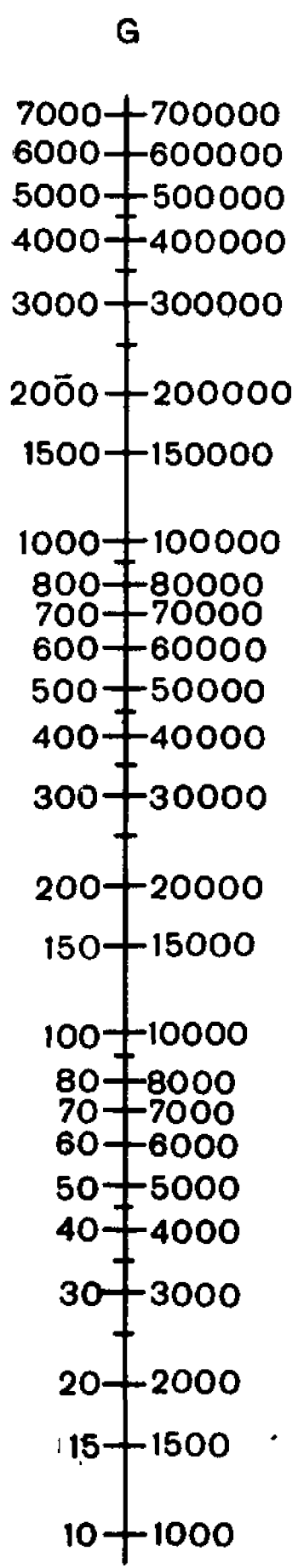
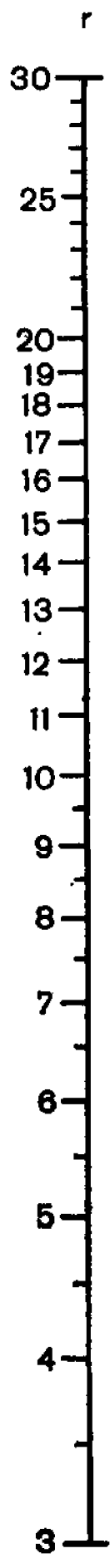
Если в обоих контрольных опытах получены положительные результаты, но нет стимуляции включения при добавлении мРНК, то следует обратить внимание на качество препарата мРНК. Правила, которых следует придерживаться при работе с мРНК, чтобы получить хорошо очищенные от белка препараты и избежать деградации РНК нуклеазами, изложены (Х. Бедткер, 1970). Необходимо также убедиться, что препараты РНК, вносимые в бесклеточную систему, свободны от примесей спирта, детергентов, ЭДТА и других веществ, добавляемых для ингибирования нуклеаз.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Номограмма для вычисления числа G . Число G представляет отношение ускорения центробежной силы в центрифуге ($\omega^2 r$) к ускорению силы земного тяготения ($g=980$ см/сек²). $G=1,11 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot u^2$, где r — расстояние от оси вращения до середины ячейки или пробирки в сантиметрах, u — скорость вращения ротора в об/мин.

Для расчета числа G по номограмме надо соединить прямой линией величины радиуса (r) и скорости вращения ротора (об/мин). Число G устанавливают по месту пересечения со средней шкалой. Следует обратить внимание на то, что левая сторона шкалы G соответствует левой стороне шкалы «об/мин», правая — правой.

С помощью номограммы возможно решение и обратной задачи: с целью создания определенного числа G рассчитать число об/мин для ротора известного радиуса.



ЛИТЕРАТУРА

- Алексеевко Л. П., Орехович В. Н. Новый микрометод определения монозамещенных гуанидинов на основе модифицированной реакции Сакагучи. — «Вопр. мед. химии», 1971, т. 17, с. 203—206.
- Беленький Д. М., Розенфельд Е. Л. Использование α -метилглюкозида для очистки γ -амилазы и некоторые свойства очищенного фермента. — «Докл. АН СССР», 1971, т. 199, № 3, с. 708—711.
- Беленький Д. М., Цукерман Д. Б., Розенфельд Е. Л. Очистка и свойства кислой α -глюкозидазы (γ -амилазы) из печени человека. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 927—933.
- Беляева И. Д. Редупликация ДНК в двуядерных клетках регенерирующей печени. — «Бюлл. exper. биол.», 1971, № 5, с. 99—102.
- Берман А. Е., Замараева Т. В., Мазуров В. И. О биосинтезе коллагена в бесклеточной микросомной системе из куриных эмбрионов. — «Молекулярная биол.», 1972, № 5, с. 783—790.
- Брусова Л. В., Вьюгова Л. А., Горкин В. З. Метод определения активности моноаминоксидазы мозга. — «Укр. біохім. ж.», 1965, № 3, с. 463—471.
- Букин Ю. В. Микрометод определения пиридоксалькиназы и некоторые области его применения. — «Прикладная биохимия и микробиология», 1973, т. 9, № 2, с. 286—302.
- Букин Ю. В., Сергеев А. В. Получение препарата апофермента триптофаназы *Escherichia coli*, освобожденного от примеси холофермента. — «Прикладная биохимия и микробиология», 1970, т. 6, № 4, с. 456—461.
- Видершайн Г. Я. 6-Дезоксисахара, их свойства, распространение и ферментативные превращения в организме человека и животных. — «Вопр. мед. химии», 1968, т. 14, с. 115—130.
- Видершайн Г. Я., Колибаба Л. Г. Методы определения свободных и связанных 6-дезоксигексоз. — «Вопр. мед. химии», 1971, т. 17, с. 428—439.
- Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., «Наука», 1972, 252 с.
- Георгиев Г. П., Мантьева В. Л. Информационная и рибосомальная рибонуклеиновые кислоты хромосомно-ядрышкового аппарата, методы разделения и нуклеотидный состав. — «Биохимия», 1962, т. 27, с. 949—957.
- Гинодман Л. М. Хроматография белков на ионообменниках и фракционирование смесей, содержащих белки, на колонках с сефадексом. В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича, М., 1964, с. 37—73.
- Горкин В. З. Трансформация ферментов. — «Вопр. мед. химии», 1972, т. 18, с. 118—136.
- Горкин В. З., Кривченкова Р. С. Дезаминирование некоторых биогенных моноаминов и активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий. — «Вопр. мед. химии», 1971, т. 17, с. 65—72.

- Городецкий В. К.** Определение различных редуцирующих сахаров в биологических жидкостях методом хроматографии на бумаге. В кн.: *Современные методы в биохимии*. Под ред. В. Н. Ореховича, М., 1968, с. 350—364.
- Городецкий В. К., Щорс Е. И.** Определение кетосахаров в биологических жидкостях с помощью β -индолилуксусной кислоты. — *«Вопр. мед. химии»*, 1969, т. 15, с. 310—314.
- Горяченкова Е. В., Щербатюк Л. И., Воронина Е. А.** Получение высокоочищенных препаратов диаминооксидазы из почек свиньи. — *«Биохимия»*, 1967, т. 32, с. 398—402.
- Гусев А. И.** Микрометод преципитации в агаре. — В кн.: *Иммунохимический анализ*. М., 1968, с. 99—119.
- Гурвич А. Е., Кузовлева О. Б., Туманова А. Е.** Применение иммуносорбентов в виде суспензии для определения абсолютного содержания антител. — *«Биохимия»*, 1962, т. 27, с. 246—251.
- Давыдова С. Я.** Выделение плазматических мембран животных клеток и некоторые их свойства. — *«Биохимия»*, 1968, т. 33, с. 685—693.
- Дервиз Г. В.** Методы изучения обмена хромопротеидов. — В кн.: *Биохимические методы исследования в клинике*. Под ред. А. А. Покровского. 1969, М., с. 365—367.
- 2,4-Динитрофенил-производные пептидов-субстраты** нового типа для определения активности протеолитических ферментов. Определение активности карбоксипептидаз. — *«Биохимия»*, 1973, т. 38, с. 790—795. Авт.: Л. А. Люблинская, Т. И. Вогаиова, Т. С. Пасхина, В. М. Степанов.
- Дризлих Г. И., Гурвич А. Е.** Использование антител, присоединенных к фиксированному на нерастворимой основе антигену, для специфического извлечения различных белков. — *«Биохимия»*, 1964, т. 29, с. 1054—1062.
- Егорова Т. П., Пасхина Т. С.** Очистка кининогена (брадикининогена) из плазмы крови кролика и изучение его свойств. — *«Биохимия»*, 1967, т. 32, с. 354—362.
- Елисеева Ю. Е., Орехович В. Н.** Выделение и изучение специфичности карбоксикапсина. *«Докл. АН СССР»*, 1963, т. 153, № 4, с. 954—956.
- Епифанова О. И., Терских В. В.** Метод радиоавтографии в изучении клеточных циклов. М., «Наука», 1969, 119 с.
- Златопольский А. Д., Трудолобова М. Г., Лерман М. И.** Изучение метаболизма полирибосом, связанных с эндоплазматическими мембранами. — *«Биохимия»*, 1973, т. 38, с. 124—135.
- Ивлев В. А., Ивлева И. Н., Садков А. П.** Манометрический стеклянный сосуд для измерения низких давлений в присутствии жидкой фазы. — В кн.: *Машины и приборы для испытания материалов*. М., 1971, с. 200—201.
- Изучение α -1,4- и α -1,6-полиглюкозидаз животных тканей.** — *«Биохимия»*, 1959, т. 24, с. 1047—1053. Авт.: Е. Л. Розенфельд, И. С. Лукомская, Н. К. Рудакова, А. И. Шубина.
- Казакова О. В., Орехович В. Н.** Выделение катепсинов группы D с помощью хроматографии по сродству. — *«Биохимия»*, 1975, т. 40, с. 969—972.
- (Карбоксикапсин — ключевой компонент двух физиологических систем, участвующих в регуляции кровяного давления).** Carboxycathepsin — a key regulatory component of two physiological systems involved in regulation of blood pressure. — *«Clin.*

- chim. Acta», 1971, v. 31, p. 413—419. Aut.: Yu. È. Eliseeva, V. N. Orekhovich, L. V. Pavlikhina, L. P. Alexeenko.
- Карбоксикатепсин** — ключевой фермент двух систем, регулирующих кровяное давление. — «Вопр. мед. химии», 1970, т. 16, с. 646—649. Авт.: Ю. Е. Елисеева, В. Н. Орехович, Л. В. Павлихина, Л. П. Алексеенко.
- Карманский И. М.** Выделение и изучение четвертичной структуры фитогемагглютинаина. Дис. канд., М., 1972.
- (Количественное определение степени чистоты препаратов субклеточных структур). A quantitative estimation of degree of purity of preparations of subcellular structures. — «Analyt. Biochem.», 1973, v. 54, p. 223—233. Aut.: A. J. Archakov, L. F. Panchenko, A. B. Kapitanov, J. J. Efron, T. A. Knyazeva, N. S. Zherbakova.
- Крайнова Б. Л., Кипоренко С. С., Чаман Е. С.** Синтез о-гиппурил-δ-гуанидинио-α-L-оксивалериановой кислоты (о-гиппурил-L-аргининовой кислоты). — «Ж. орг. химии», 1970, т. 40, с. 708—709.
- Лауфер А. Л., Гуликова О. М., Пасхина Т. С.** О двух кининогеназах в плазме крови человека. — «Биохимия», 1969, т. 34, с. 3—6.
- Лейтин В. Л., Лерман М. И.** Изучение полирибосом из клеток печени крысы. Препаративный метод получения полирибосом. — «Биохимия», 1969, т. 34, с. 839—848.
- Лейтин В. Л., Лерман М. И.** Определение времени синтеза полипептидной цепи в опытах на животных. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 513—520.
- Лейтин В. Л., Лерман М. И.** Кинетика синтеза полипептидной цепи in vivo: эффект ингибиторов трансляции. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 1060—1070.
- Лукомская И. С., Городецкий В. К.** Применение микроцида (глюкозооксидазы) для определения глюкозы в крови в норме и при диабете. — «Биохимия», 1961, т. 26, с. 477—482.
- Методы исследования активности и специфического торможения моноаминоксидаз митохондрий.** В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича, М., 1968, с. 155—177. Авт.: В. З. Горкин, И. В. Вережкина, Л. И. Гриднева, Л. В. Жердева, Л. Б. Кляшторин, Р. С. Кривченкова, Н. В. Комиссарова, Г. А. Леонтьева, Л. А. Романова, И. С. Северина, С. М. Фейгина.
- Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С.** Очистка и свойства кислотостабильного ингибитора трипсина из сыворотки крови кролика. — «Биохимия», 1969, т. 34, с. 282—292.
- Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С.** Кинетика торможения активности термо- и кислотостабильным ингибитором из сыворотки крови кролика. — «Биохимия», 1970, т. 35, с. 187—195.
- Никольский Б. П., Шульц Т. Т., Пешехонова Н. В.** Теория стеклянного электрода. VII Влияние посторонних ионов на натриевую и калиевую функцию стеклянных электродов. — «Ж. физ. химии», 1958, т. 32, № 1, с. 19—26.
- О возможности «трансформации» митохондриальной моноаминоксидазы в диаминоксидазоподобный фермент.** — «Вопр. мед. химии», 1968, т. 14, с. 538—554. Авт.: В. З. Горкин, Ж. И. Акопян, Е. Н. Гончаренко, Ю. Б. Кудряшов.
- О структуре рибосом из печени.** — «Молекулярная биол.», 1973, т. 7, № 4, с. 609—619. Авт.: Н. А. Киселев, В. Я. Стельмашук, М. И. Лерман, О. Ю. Абакумова.
- Определение брадикинина при помощи биологических и хроматографических методов.** В кн.: Современные методы в биохимии. Под

- ред. В. Н. Ореховича, М., 1968, с. 205—231. Авт.: Т. С. Пасхина, О. М. Гуликова, Т. П. Егорова, М. С. Суровикина, Р. К. Шмырева.
- Очистка и модифицирование каталитических свойств аминоксидаз.* — «Вопр. мед. химии», 1972, т. 18, с. 356—364. Авт.: Ж. И. Акопян, Р. И. Гвоздев, Г. У. Молодых, Л. Н. Стесина, Л. В. Татьянаенко, Г. Н. Яковлева, В. З. Горкин.
- Пасхина Т. С.* Биохимические основы патологии сердечно-сосудистой системы (механизм образования, обмен и роль при сосудистых патологиях кининов плазмы крови). В кн.: Молекулярные основы патологии. Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1966, с. 123—172.
- Пасхина Т. С.* Энзиматический механизм образования и распада кининов. — В кн.: Современные вопросы эндокринологии. Под ред. Н. А. Юдаева, Вып. 4. Химия и биология пептидно-белковых гормонов. М., 1972, с. 108—122.
- Пасхина Т. С., Егорова Т. П.* Очистка и свойства кининогена (брадикининогена) из сыворотки крови кролика. — «Биохимия», 1966, т. 31, с. 468—476.
- Пасхина Т. С., Нартикова В. Ф.* Кислотостабильный ингибитор трипсина, плазмина и калликреина из сыворотки крови кролика. — «Вопр. мед. химии», 1966, т. 12, с. 326—327.
- Пасхина Т. С., Яровая Г. А.* Калликреин сыворотки крови человека. Активность фермента и хроматографический метод определения. — «Биохимия», 1970, т. 35, с. 1055—1058.
- Пасхина Т. С., Доценко В. Л., Блинникова Е. И.* Калликреиноген сыворотки крови человека. Метод определения и некоторые свойства. — «Биохимия», 1973, т. 33, с. 420—423.
- Пасхина Т. С., Кринская А. В., Зыкова В. П.* Сравнительное влияние ингибиторов трипсина пептидно-белковой природы (основного панкреатического ингибитора трипсина, ингибиторов из молозива коровы и бобов сои) на калликреины из сыворотки крови человека и кролика. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 302—309.
- Пособие по гистоавторадиографии.* Л., 1960, 51 с. Авт.: Н. Д. Грачева, Г. С. Лыкова, Л. В. Фунштейн, Э. Н. Щербань.
- Роль кининовой системы в патогенезе ожоговой болезни человека.* — «Вопр. мед. химии», 1972, т. 18, с. 137—145. Авт.: Т. С. Пасхина, М. И. Шрайбер, Г. А. Яровая, Н. А. Морозова, В. Ф. Нартикова, С. С. Трапезникова, В. Л. Доценко, О. В. Макарова, Т. М. Маслова.
- Состояние системы калликреиноген-калликреин в сыворотке крови больных с поражениями печени.* — В кн.: Материалы 2-го Всесоюз. симпозиума по медицинской энзимологии. Душанбе, 1974, с. 21—22. Авт.: Т. С. Пасхина, З. А. Бондарь, А. В. Кринская, Д. Г. Поликарпова.
- Спирин А. С.* Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. — «Биохимия», 1958, т. 23, с. 656—662.
- Торчинский Ю. М.,* Сульфгидрильные и дисульфидные группы белков. М., «Наука», 1971, 230 с.
- Трапезникова С. С., Пасхина Т. С.* Выделение, очистка и свойства карбоксипептидаз (кининаз) из сыворотки крови человека и кролика. — «Биохимия», 1968, т. 33, с. 1012—1022.
- Файс Д., Шакулов Р. С., Клячко Е. В.* Диссоциация монорибосом животных клеток. — «Молекулярная биол.», 1970, т. 4, № 2, с. 232—239.

Характеристика рибосомного материала клеток печени крыс, отравленных этионином. Получение и свойства активных рибосомных субъединиц из одиночных рибосом, накапливающихся при действии этионина. — «Биохимия», 1973, т. 38, с. 35—51. Авт.: О. Ю. Абакумова, Д. А. Иванов, Т. Ю. Угарова, В. Г. Шелехова, М. И. Лерман.

Химические и биологические методы определения основных компонентов кининовой системы крови (кининогена, калликреина, ингибиторов калликреина, кининазы). — В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича, М., 1968, с. 237—241. Авт.: Т. С. Пасхина, Т. П. Егорова, В. П. Зыкова, А. Л. Лауфер, С. С. Трапезникова, Е. Е. Шимонаева.

Цветков В. С., Иммуноэлектрофорез и препаративный электрофорез в агаре. — В кн.: Иммунохимический анализ. М., 1968, с. 120—142.

Ямафудзи Кэйко, Идзумия Нобуо. Механизм активности кининогена. — «Кагаку, Chemistry» (Яп.), 1971, т. 26, с. 114—118. Реф. «Рефер. ж. биол. химия», 1971, 13Ф602.

A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. — «J. biol. Chem.», 1958, v. 231, p. 241—257. Aut.: M. B. Hoagland, M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. I. Hecht, P. C. Zamecnik.

Adelman M. R., Blobel G., Sabatini D. D. An improved cell fractionating procedure for the preparation of rat liver membrane bound ribosomes. — «J. Cell Biol.», 1973, v. 56, p. 191—205.

Anderson G. W., Zimmermann G. E., Gallahan F. The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. — «J. Am. chem. Soc.», 1964, v. 86, p. 1839—1842.

Astrup T. Comparative studies of some antifibrinolytic agents and proteinase inhibitors. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1968, v. 146, p. 601—611.

Aviv U., Boime J., Lederer P. Protein synthesis directed by encephalomyocarditis virus RNA: properties of transfer RNA-dependent system. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1971, v. 68, p. 2303—2307.

Barker S. B., Summerson W. H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. — «J. biol. Chem.», 1941, v. 138, p. 538—554.

Beeley I. G., McCarins E. Selective isolation of ovomucoid using an insolubilized trypsin derivative. — «Biochem., biophys. Acta», 1970, v. 271, p. 204—213.

Bergman I., Loxley A. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. — «Analyt. Chem.», 1963, v. 35, p. 1961—1965.

Bhattacharyya A. K., Aminoff D. Estimation of free methylpentoses in the presence of glycosidically bound sugar. — «Analyt. Biochem.», 1966, v. 14, p. 278—289.

Blobel G., Potter V. R. Ribosomes in rat liver: an estimate of the percentage of free and membrane bound ribosomes interacting with messenger RNA in vivo. — «J. molec. Biol.», 1967, v. 28, p. 539—542.

Blobel G., Potter V. R. Distribution of radioactivity between the acid-soluble pool and the pools of RNA in the nuclear nonsedimentable and ribosome fractions of rat liver after a single injection of labeled orotic acid. — «Biochim. biophys. Acta», 1968, v. 166, p. 48—57.

Blobel G., Sabatini D. Dissociation of mammalian polyribosomes into

- subunits by puromycin. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1971, v. 68, p. 390—394.
- (Boedtker H.) Бедткер Х. Молекулярный вес и конформация РНК. В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., 1970, с. 251—272.
- Brawermann G., Mendecki J., Lee S. J. A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. — «Biochemistry (Wash.)», 1972, v. 11, p. 637—641.
- Breakdown and reassembly of rat liver ergosomes after administration of ethionine or puromycin. — «J. biol. Chem.», 1964, v. 239, p. 3826—3833. Aut.: S. Villa Trevino, E. Farber, T. Staehelin, F. O. Wettstein, H. Noll.
- Breuer B., Florini J. R. Amino acid incorporation into protein by cell-free systems from rat skeletal muscle. — «Biochemistry (Wash.)», 1965, v. 4, p. 1544—1549.
- Bruni C. B., Auricchio F., Covelli I. Acid- α -D-glucoside glycohydrolase from cattle liver. — «J. biol. Chem.», 1969, v. 244, 4735—4748.
- Brunschede H., Bremer H. Synthesis and breakdown of proteins in *Escherichia coli* during aminoacid starvation. — «J. molec. Biol.», 1971, v. 57, p. 35—57.
- Butterworth P. H., Baum H., Porter J. W. A modification of the Ellman procedure for the estimation of protein sulfhydryl groups. — «Arch. Biochem.», 1967, v. 118, p. 716—723.
- Galdwell P. C. An investigation of the intracellular pH of crab muscle fibres by means of micro-glass and microtungstein electrodes. — «J. Physiol. (Lond.)», 1954, v. 126, p. 169—180.
- Carboxypeptidase in blood and other fluids. Values in human blood in normal and pathological conditions. — «Clin. chim. Acta», 1965, v. 11, p. 39—43. Aut.: E. G. Erdős, J. W. Woher, M. I. Levine, M. P. Westerman.
- Carboxypeptidase in blood and other fluids. III. The esterase activity of the enzyme. — «Biochem. Pharmacol.», 1967, v. 16, p. 1287—1297. Aut.: E. G. Erdős, H. Y. Yang, L. L. Tague, N. Manning.
- Charles F. H., John A. J. Rat liver membrane preparations. — «Analyt. Biochem.», 1972, v. 49, p. 290—293.
- Chauveau J., Moule J., Rouiller C. Isolation of pure and unaltered liver nuclei. Morphology and biochemical composition. — «Exp. Cell Res.», 1956, v. 11, p. 317—321.
- Chauvet I., Acher R. Isolation of a trypsin inhibitor from bovine ovary by affinity chromatography through trypsinsepharose. — «FEBS Letters», 1972, v. 23, p. 317—320.
- Chemistry of renin substrate. — «Canad. med. Ass. J.», 1964, v. 90, p. 185—200. Aut.: L. T. Skeggs, K. E. Leutz, H. Hochstrasser, J. R. Kohn.
- Chromosome constitution of a human phenotypic intersex. — «Am. J. hum. Genet.», 1959, v. 11, p. 215—236. Aut.: D. A. Hungerford, A. J. Donnelly, P. C. Nowell, S. Beck.
- Cirrhosis associated with alfa-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorders. — «J. Lab. clin. Med.», 1969, v. 73, p. 934—939. Aut.: H. L. Sharp, R. A. Bridges, W. Krivit, E. F. Freier.
- Claude A. Studies on cells: morphology, chemical constitution and distribution of biochemical functions. — «Harvey Lect.», 1948, v. 43, p. 121—164.

- Cohen S.* Purification of a nerve growth-promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1960, v. 46, p. 302—311.
- Colman R. W., Mattler L., Sherry S.* Studies on the prekallikrein (kallikreinogen)-kallikrein in enzyme system of human plasma. 1. Isolation and purification of plasma kallikreins. — «J. clin. Invest.», 1969, v. 48, p. 11—22.
- Cooper R.* The colorimetric measurement of succinate dehydrogenase activity in subcellular fractions. — «J. Biol. Educ.», 1967, v. 1, p. 57—63.
- Corvol P., Devaux C., Menard J.* Pepstatin, an inhibitor for renin purification by affinity chromatography. — «Febs Letters», 1973, v. 34, p. 189—193.
- Cuatrecasas P., Anfinsen C. B.* Affinity chromatography. — In: Methods in enzymology, v. 22. New York, 1971, v. 345—379.
- Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B.* Selective enzyme purification by affinity chromatography. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1968, v. 61, p. 636—643.
- Dahlqvist A.* Assay of intestinal disaccharidases. — «Enzymol. biol. clin.», 1970, v. 11, p. 52—66.
- Dahlqvist A., Brun A.* A method for the histochemical demonstration of disaccharidase activities application to invertase and trehalase in some animal tissues. — «J. Histochem. Cytochem.», 1962, v. 10, p. 294—302.
- Dallner G.* Studies on the structural and enzymic organisation of the membranous elements of liver microsomes. — «Acta pathol. microbiol. scand.», 1963, Suppl. 166, 94 p.
- Dallner G., Ernster L.* Subfractionation and composition of microsomal membranes: a review. — «J. Histochem. Cytochem.», 1968, v. 16, p. 611—632.
- Darnell J. E., Wull R., Tushinski R. J.* An adenylic acid-rich sequence in messenger RNA of HeLa cells and its possible relationship to reiterated sites of DNA. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1971, v. 68, p. 1321—1325.
- Davis B. J.* Disc electrophoresis. 11. Method and application to human serum proteins. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1964, v. 121, p. 404—427.
- Detection and isolation of a second acid stable proteinase inhibitor from human bronchial mucus.* — «Hoppe — Seyler's Z. physiol. Chem.», 1973, Bd 354, S. 923—926. Aut.: K. Hochstrasser, R. Reichert, S. Schwarz, S. Werle.
- Dische L., Shettles L. B.* A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. — «J. biol. Chem.», 1948, v. 175, p. 595—603.
- Draper O. J., Pollard A. L.* The purification of phenol for paper partition chromatography. — «Science», 1949, v. 109, p. 448—449.
- Eagle H.* Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. — «Science», 1959, v. 130, p. 432—437.
- Earl D. C., Korner A.* The isolation and properties of cardiac ribosomes and polysomes. — «Biochem. J.», 1965, v. 94, p. 721—734.
- Ehrenstein G.* Isolation of RNA from intact Escherichia coli cells. — In: Methods in enzymology, v. 12. New York, 1968, p. 588—596.
- (Eisenman G.) Эйзенман Дж.* Катион-селективные стеклянные электроды и их применение. — В кн.: Вопросы биофизики. М., 1964, с. 215—265.

- Ekren T.* Distribution of free and membrane-bound ribosomes after corticosterone administration in perfused rat liver. — «Mol. Biol. Reports», 1973, v. 1, p. 161—165.
- Ellman G. L.* Tissue sulfhydryl groups. — «Arch. Biochem.», 1959, v. 82, p. 70—77.
- Emmelot P., Bos C. J., Benedetti E. L.* Studies on plasma membranes: 1. Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. — «Biochim. biophys. Acta», 1964, v. 90, p. 126—145.
- Enzymic methods for the micro-assay of D-mannose, D-glucose, D-galactose and L-fucose from acid hydrolysates of glycoproteins.* — «Analyt. Biochem.», 1969, v. 31, p. 296—305. Aut. P. R. Finch, R. Yuen, H. Schachter, M. A. Moscarello.
- Erdős E. G.* Enzymes that inactivate polypeptides. — «Biochem. Pharmacol.», 1961, v. 8, p. 112—113.
- Falvey A. K., Staehelin T.* Structure and function of mammalian ribosomes. 1. Isolation and characterization of active liver ribosome subunits. — «J. molec. Biol.», 1970, v. 53, p. 1—19.
- Feinstein G., Gertler A.* Isolation of alkaline proteinases from *Aspergillus oryzae* by one-step affinity chromatography on ovo-inhibitor-sepharose column. — «Biochim. biophys. Acta», 1973, v. 309, p. 196—202.
- Felix K.* Protamins. — «Adv. Protein Chem.», 1960, v. 15, p. 1—30.
- Fleck A., Munro H. N.* The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation. — «Biochim. biophys. Acta», 1962, v. 55, p. 571—583.
- Folk J. E., Glander J. A.* Carboxypeptidase B. III. Specific esterase activity. — «Biochim. biophys. Acta», 1959, v. 33, p. 570—572.
- Fuller G. C., Langner R. O.* Elevation of aortic proline hydroxylase: a biochemical defect in experimental arteriosclerosis. — «Science», 1970, v. 168, p. 987—988.
- (Gilman H.) Гильман Г. (ред.) Синтезы органических препаратов.* Сб. 1, пер. с англ. М., Гос. изд-во иностран. лит-ры. с. 193.
- Glenner G. C., Burtner H. J., Brown G. W.* The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrasolium salts. — «J. Histochem. Cytochem.», 1957, v. 5, p. 591—600.
- Graham J. L., Grunbaum B. W.* A rapid method for microelectrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate. — «Am. J. clin. Path.», 1963, v. 39, p. 567—578.
- Green N. M.* Competition among trypsin inhibitors. — «J. biol. Chem.», 1953, v. 205, p. 535—551.
- Gustafson A., Alaupovic P., Furman R. H.* Studies of the composition and structure of serum lipoproteins: isolation, purification and characterization of very low density lipoproteins in human serum. — «Biochemistry (Wash.)», 1965, v. 4, p. 596—605.
- Haas E., Goldblatt H., Gipson E. C.* Extraction, purification and acetylation of human renin and the production of antirenin to human renin. — «Arch. Biochem.», 1965, v. 110, p. 534—543.
- Haberman E.* Kininogens. — In: Handbuch der Experimentellen Pharmakologie. Bd 25, Berlin, 1970, S. 250—288.
- Hallinan T., Fleck A., Munro H. N.* Loss of ribonucleic acid into lipid solvents after acid precipitation. — «Biochim. biophys. Acta», 1963, v. 68, p. 131—133.

- Halme J., Kivirikko K. I., Simons K.* Isolation and partial characterization of highly purified procollagen proline hydroxylase. — «Biochim. biophys. Acta», 1970, v. 198, p. 460—470.
- Handel E.* Direct microdetermination of sucrose. — «Analyt. Biochem.», 1968, v. 22, p. 280—283.
- Hannuksela M., Rasmussen O., Uitto J.* Procollagen proline hydroxylase activity in the skin of patients with connective tissue disorders. — «Scand. J. clin. lab. Invest.», 1970, v. 113, Suppl. 25, p. 35—40.
- Haschemeyer A. E.* Rates of polypeptide chain assembly in liver in vivo: relation to the mechanism of temperature acclimation in *Opsanus tau*. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1969, v. 62, p. 128—135.
- Haschke R. H., Heilmeyer L. M.* An automated assay for glycogen phosphorylase. — «Analyt. Biochem.», 1972, v. 47, p. 451—456.
- Haskell B. H., Snell E. E.* An improved apotryptophanase assay for pyridoxal phosphate. — «Analyt. Biochem.», 1972, v. 45, p. 567—576.
- Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H.* The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. — «J. clin. Invest.», 1955, v. 34, p. 1345—1353.
- Hedrick J., Fischer H.* On the role of pyridoxal-5'-phosphate in phosphorylase. 1. Absence of classical vitamin B₆ dependent enzymatic activities in muscle glycogen phosphorylase. — «Biochemistry (Wash.)», 1965, v. 4, p. 1337—1342.
- Heimburger N., Haupt H., Schwick H. G.* Proteinase inhibitors of human plasma. — In: Proceedings of International research conference on proteinase inhibitors. H. Fritz, H. Tschesche (Eds). New York, 1971, p. 1—24.
- Helmreich E., Cori C.* The role of adenylic acid in the activation of phosphorylase. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1964, v. 51, p. 131—146.
- Hers H. G.* α -Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). — «Biochem. J.», 1963, v. 86, p. 11—16.
- Hers H. G.* Glycogen storage disease. — In: Advances in Metabolic disorders, R. Levine, R. Luft R. (Eds). v. 1. New York, 1964, p. 1—44.
- Hers H. G., Verne W., Van Hoof F.* The determination of amylo-1,6-glycosidase. — «Europ. J. Biochem.», 1967, v. 2, p. 257—264.
- Heyrovsky A.* A new method for the determination of inulin in plasma and urine. — «Clin. chim. Acta», 1956, v. 1, p. 470—474.
- Heywood S. M., Dowben R. M., Rich A.* A study of muscle polyribosomes and the coprecipitation of polyribosomes with myosin. — «Biochemistry (Wash.)», 1968, v. 7, p. 3289—3296.
- Hochstrasser K., Feuth H., Stoiner A.* Zur Charakterisierung der saurenstabilen Proteaseinhibitoren aus human Plasma. — «Hoppe — Seyler's Z. physiol. Chem.», 1973, Bd 354, S. 927—932.
- Hollunger G., Orelund L.* Preparation of soluble monoamine oxidase from pig liver mitochondria. — «Arch. Biochem.», 1970, v. 139, p. 320—328.
- Holmstedt B., Larsson L., Tham R.* Further studies of a spectrophotometric method for the determination of diamine oxidase activity. — «Biochim. biophys. Acta», 1961, v. 48, p. 182—186.
- Hoof F., Hers H. G.* The abnormalities of lysosomal enzymes in mucopolysaccharidoses. — «Europ. J. Biochem.», 1968, v. 7, p. 34—44.

- Huijing F.* A rapid enzyme method for glycogen estimation in very small tissue samples. — «Clin. chim. Acta», 1970, v. 30, p. 567—572.
- Hurlbert R. B., Potter V. R.* A survey of the metabolism of orotic acid in the rat. — «J. biol. Chem.», 1952, v. 195, p. 257—270.
- Hutton J. J., Tappel A. L., Udenfriend S.* A rapid assay for collagen proline hydroxylase. — «Analyt. Biochem.», 1966, v. 16, p. 384—390.
- Illingworth B., Cori G. T.* Crystalline muscle phosphorylase. — «Biochem. Preparations», 1953, v. 3, p. 1—9.
- Immunochemical precipitation of polyribosomes.* — «Biochem. biophys. Acta», 1971, v. 247, p. 104—108. Aut.: C. Holme, T. L. Delovitch, S. L. Boyd, A. H. Sehon.
- Increased efficiency of exogenous messenger RNA-translation in a Krebs ascites cell lysate.* — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1972, v. 69, p. 1299—1303. Aut.: S. Metafora, M. Terada, L. W. Dow, P. A. Marks, A. Bank.
- Jakoby W. B.* A technique for the crystallization of proteins. — «Analyt. Biochem.», 1968, v. 26, p. 295—298.
- Johns E. W.* Studies on histones. — «Biochem. J.», 1964, v. 92, p. 55—59.
- Juva K., Prockop D. J.* Modified procedure for the assay of H³- or C¹⁴-labeled hydroxyproline. — «Analyt. Biochem.», 1966, v. 15, p. 77—83.
- Kalkar H. M.* Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. 111. Studies of the enzymes of purine metabolism. — «J. biol. Chem.», 1947, v. 167, p. 461—481.
- Kallikrein-bradykinin system in chronic alcoholic liver disease.* — «Ann. intern. Med.», 1972, v. 77, p. 205—209. Aut.: P. Wong, R. W. Coleman, R. C. Talamo, B. M. Babior.
- Katz S., Comb D. G.* A new method for the determination of the base composition of ribonucleic acid. — «J. biol. Chem.», 1963, v. 238, p. 3065—3067.
- (Kennell D.) Кеннел Д.* Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., 1970, с. 138—144.
- Khuri Raja N.* Glass microelectrodes and their uses in biological systems. — In: Glass electrodes for hydrogen and other cations. Ed. G. Eisenman. New York, 1967, p. 479—519.
- Kivirikko K. J., Prockop D. J.* Purification and partial characterization of the enzyme for the hydroxylation of proline in protocollagen. — «Arch. Biochem.», 1967, v. 118, p. 611—618.
- Korn E. D.* The assay of lipoprotein lipase in vivo and in vitro. — In: «Methods of biochemical analysis», v. 7, Ed. D. Glick. New York, 1959, p. 145—192.
- Korner A.* Incorporation of radioactive amino acids into serum albumin by isolated rat liver ribosomes. — «Biochem. J.», 1962, v. 83, p. 69—74.
- Krebs H. A.* Body size and tissue respiration. — «Biochem. biophys. Acta», 1950, v. 4, p. 249—269.
- Krisman C. R.* A method for the colorimetric estimation of glycogen with the iodine. — «Analyt. Biochem.», 1962, v. 4, p. 17—23.
- Lange R. J., Smith E. L.* Histones: structure and function. — «Ann. Rev. Biochem.», 1971, v. 40, p. 279—314.

- Laurell C. B., Eriksson S.* The serum α_1 -antitrypsin in families with hypo- α_1 -antitrypsinemia. — «Clin. chim. Acta», 1965, v. 11, p. 395—402.
- Levi-Montalcini R., Hamburger V.* A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotisation of the chick embryo. — «J. exp. Zool.», 1953, v. 123, p. 253—288.
- Lewis J. A., Tata J. R.* A rapidly sedimenting fraction of rat liver endoplasmic reticulum. — «J. Cell Sci.», 1973, v. 13, p. 447—461.
- Lindberg V., Persson T.* Isolation of mRNA from KB-cells by affinity chromatography on polyuridylic acid covalently linked to sepharose. — «Europ. J. Biochem.», 1972, v. 31, p. 246—254.
- Lindgren F. T., Jensen L. C.* The isolation and quantitative analysis of serum lipoproteins. — In: Blood lipids and lipoproteins: quantitation, composition and metabolism. Ed. G. J. Nelson. New York, 1972, p. 181—274.
- Mason M., Fasella P.* Assay of glycogen phosphorylase by differential spectropolarimetry. — «Analyt. Biochem.», 1971, v. 43, p. 57—65.
- Mathews R. W., Oronsky A., Haschemeyer A. E.* Effect of thyroid hormone on polypeptide chain assembly kinetics in liver protein synthesis in vivo. — «J. biol. Chem.», 1973, v. 248, p. 1329—1333.
- (*Maurer H. R.*) *Маурер Г.* Диск-электрофорез. Пер. с нем. М., «Мир», 1971, 62 с.
- Martin T. E.* A simple general method to determine the proportion of active ribosomes in eucariotic cells. — «Exp. Cell Res.», 1973, v. 80, p. 496—498.
- McCormick D. B., Gregory M. E.* Pyridoxal phosphokinase. 1. Assay distribution, purification and properties. — «J. biol. Chem.», 1961, v. 236, p. 2076—2084.
- McCormick D. B., Snell E. E.* Pyridoxal kinases (ATP: pyridoxal 5-phosphotransferase, EC 2.7.1.35) from bacteria and from mammalian tissues. — In: Methods in enzymology. v. 18. Vitamins and coenzymes. D. B. McCormick, L. D. Wright (Eds), New York, 1970, p. 611—619.
- Mihalyi E., Godfrey J. E.* Digestion of fibrinogen by trypsin. 1. Kinetic studies of the reaction. — «Biochim. biophys. Acta», 1963, v. 67, p. 73—89.
- Moore S., Stein W. H.* A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. — «J. biol. Chem.», 1954, v. 211, p. 907—913.
- Motokawa J., Kikuchi G.* Glycine metabolism in rat liver mitochondria. — «Arch. Biochem.», 1971, v. 146, p. 461—466.
- Murray K.* The basic proteins in cell nuclei. — «Ann. Rev. Biochem.», 1965, v. 34, p. 209—238.
- Nash T.* Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. — «Biochem. J.», 1953, v. 55, p. 416—421.
- Nelson N.* Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. — «J. biol. Chem.», 1944, v. 153, p. 375—380.
- Neuman R. E., Logan M. A.* The determination of hydroxyproline. — «J. biol. Chem.», 1950, v. 184, p. 299—306.
- Neville D. M.* The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. — «J. biophys. biochem. Cytol.», 1960, v. 8, p. 413—421.

- (Northrop J., Kunitz M., Herriott R.) Нортрон Д., Кунитц М., Херriott Р. Кристаллические ферменты. Пер. с англ. М., Изд-во иностран. лит-ры, 1950, с. 297.
- Nowell P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. — «Cancer Res.», 1960, v. 20, p. 462—466.
- Ohman R., Ekelund H., Svennerholm L. The diagnosis of Tay — Sachs disease. — «Acta paediat. scand.», 1971, v. 60, p. 399—406.
- Okada K., Fujii S., Wada M. Microassay of pyridoxal phosphate using tryptophan-¹⁴C with tryptophanase. — In: Methods in enzymology. v. 18. Vitamins and coenzymes. McCormick D., Wright L. D. (Eds). New York, 1970, p. 505—509.
- Okada S., O'Brien J. Tay — Sachs disease. Generalized absence of a β -D-N-acetylhexosaminidase component. — «Science», 1969, v. 165, p. 698—700.
- Omura T., Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. — «J. biol. Chem.», 1964, v. 239, p. 2379—2385.
- On the lability of poly A sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. — «Biochim. biophys. Acta», 1972, v. 262, p. 220—226. Aut.: R. P. Perry, J. La Torre, D. E. Kelley, J. R. Greenberg.
- Oreland L. Purification and properties of pig liver mitochondrial monoamine oxidase. — «Arch. Biochem.», 1971, v. 146, p. 410—421.
- Osborn M. J., Huennekens F. M. Participation of anhydroleucovorin in the hydroxymethyl tetrahydrofolic dehydrogenase system. — «Biochim. biophys. Acta», 1957, v. 26, p. 646—649.
- Osgood E., Brooke J. H. Continuous tissue culture of leucocytes from human leucemic bloods by application of «gradient» principles. — «Blood», 1955, v. 10, p. 1010—1018.
- Oss C. J. Van, Bronson P. M. Characteristics of protein concentrating anisotropic cellulose acetate membrane. — «Separation Sci.», 1970, v. 7, p. 63—75.
- Oxidation of p-dimethylaminomethylbenzylamine by pig kidney diamine oxidase. A new spectrophotometric assay. — «Biochem. J.», 1972, v. 127, p. 875—879. Aut.: W. G. Bardsley, M. J. Grabbe, J. S. Schindler, J. S. Ashford.
- Palmiter R., Oka T., Schimke R. Modulation of ovalbumin synthesis by estradiol-17 and actinomycin D as studied in explants of chick oviduct in culture. — «J. biol. Chem.», 1971, v. 246, p. 724—737.
- Palmiter R., Palacios R., Schimke R. T. Identification and isolation of ovalbumin — synthesizing polysomes. II. Quantification and immunoprecipitation of polysomes. — «J. biol. Chem.», 1972, v. 247, p. 3296—3304.
- Palter K., Lukton A. A titrimetric assay for glycogen phosphorylase. — «Analyt. Biochem.», 1973, v. 53, p. 613—623.
- Peralta S. Argininuria, convulsiones y oligofrenia, un nuevo error innato del metabolismo? — «Rev. Clin. Esp.», 1965, v. 97, p. 176—184.
- Percheron M. F. Dosage colorimetrique du fructose et des fructofuranosides par l'acide thiobarbiturique. — «C. R. Acad. Sci. (Paris)», 1962, v. 255, p. 2521—2522.
- Peterkofsky B., Diegelman R. F. Use of a mixture of proteinasefree collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the

- presence of other proteins. — «Biochemistry (Wash.)», 1971, v. 10, p. 988—994.
- Peterson E. A.* Cellulosic ion exchangers. — In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. E. S. Work, E. Work (Eds). Amsterdam, 1970, p. 163.
- Phillips D. M., Johns E. W.* A fractionation of the histones of group F_{2a} from calf thymus. — «Biochem. J.», 1965, v. 94, p. 127—130.
- Phillips G. R., West J.* Purification of protamine sulphate for the quantitative precipitation of ribonucleic acids. — «Biochim. biophys. Acta», 1964, v. 91, p. 416—420.
- Piquilloud J., Reinharz A., Roth M.* Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. — «Biochim. biophys. Acta», 1970, v. 206, p. 136—142.
- Portnoy H. D., Thomas L. M., Gurdjian E. S.* Measuring cation activity of living brain. — «Arch. Neurol. (Chic.)», 1963, v. 8, p. 597—607.
- Potter M., Appela E., Geiser S.* Variations in the heavy polypeptide chain. Structure of gamma myeloma immunoglobulins from an inbred strain of mice and a hypothesis as to their origin. — «J. Molec. Biol.», 1965, v. 14, p. 361—372.
- Prockop D. J., Ebert P. S.* A simple method for differential assay of tritium and carbon-14 in water-soluble biological materials. — «Analyt. Biochem.», 1963, v. 6, p. 263—271.
- Prockop D. J., Udenfriend S.* A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissue and urine. — «Analyt. Biochem.», 1960, v. 1, p. 228—239.
- Protein measurement with folin phenol reagent.* — «J. biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265—275. Aut.: O. H. Lowry, N. F. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall.
- Protocollagen* proline hydroxylase activity in experimental pulmonary fibrosis of rat. — «J. lab. Clin. Med.», 1970, v. 75, p. 535—541. Aut.: J. Halme, J. Uitto, K. Kahanpaa, P. Karhuneu, S. Lindy.
- Reardon J., Foreman J. A., Searcy R. L.* New reactants for the colorimetric determination of ammonia. — «Clin. chim. Acta», 1966, v. 14, p. 403—405.
- Recknagel R. O., Choshal A. K.* Lipoperoxidation of rat liver microsomal lipids by carbon tetrachloride. — «Nature», 1966, v. 210, p. 1162—1163.
- Rigas D., Johnson E.* Studies on the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris* and its mitogenicity. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1964, v. 113, p. 800—813.
- Robyt J. F., Ackerman R. J., Chittenden C. G.* Reaction of protein disulfide groups with Ellman's reagent: a case study of the number of sulfhydryl and disulfide groups in *Aspergillus oryzae* α -amylase, papain and lysozyme. — «Arch. Biochem.», 1971, v. 147, p. 262—269.
- Roering D. L., Mascaro L., Aust S. D.* Microsomal electron transport: tetrazolium reduction by rat liver microsomal NADPH — cytochrome *c* reductase. — «Arch. Biochem.», 1972, v. 153, p. 475—479.
- Salk J. E.* A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza-virus and the corresponding antibody. — «J. Immunol.», 1944, v. 49, p. 87—98.
- Sanger F.* Fractionation of oxidized insulin. — «Biochem. J.», 1949, v. 44, p. 126—128.
- Sauer L. A., Burrow G. N.* The submicrosomal distribution of radioactive proteins released by puromycin from the bound ribosomes

- of rat liver microsomes labelled in vitro. — «Biochim. biophys. Acta», 1972, v. 277, p. 179—187.
- Scely J. H., Petitclere L. C., Benoiton L.* Interference by protein and amines in the determination of ammonia by the isocyanurate method. — «Clin. chim. Acta», 1967, v. 18, p. 85—86.
- Schirch L. V., Mason M.* Serine transhydroxymethylase: spectral properties of the enzyme-bound pyridoxal-5-phosphate. — «J. biol. Chem.», 1963, v. 238, p. 1302—1311.
- Schlunk F. F., Longnecker D. S., Lombardi B.* On the ethionine — induced inhibition of protein synthesis in male and female rats — lack of effect on intestinal mucosa. — «Biochim. biophys. Acta», 1968, v. 158, p. 425—434.
- Schmidt G., Thannhauser S. J.* A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphorproteins in animal tissues. — «J. biol. Chem.», 1945, v. 161, p. 83—89.
- Schneider C. W.* Intracellular distribution of enzymes. 111. The oxidation of octanoic acid by rat liver fractions. — «J. biol. Chem.», 1948, v. 176, p. 259—266.
- Schreier M. H., Staehelin T.* Initiation of mammalian protein synthesis: the importance of ribosome and initiation factor quality for the efficiency of in vitro systems. — «J. molec. Biol.», 1973, v. 73, p. 329—349.
- Schwartz A. M., Perry J. W., Berch J.* Surface active agents and detergents. v. 2. New York, 1958, 576 p.
- Shafritz D. A., Anderson W. F.* Isolation and partial characterization of reticulocyte factors M_1 and M_2 — «J. biol. Chem.», 1970, v. 245, p. 5553—5559.
- Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J.* Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1967, v. 28, p. 815—820.
- Sheldon R., Jurale C., Kates J.* Detection of polyadenylic acid sequences in viral and eukaryotic RNA. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1972, v. 69, p. 417—421.
- Shulman N. R.* A proteolytic inhibitor with anticoagulant activity separated from human urine and plasma. — «J. biol. Chem.», 1955, v. 213, p. 655—671.
- Smiley K. L., Berry A. J., Suelter C. H.* An improved purification, crystallization and some properties of rabbit muscle 5'-adenylic acid deaminase. — «J. biol. Chem.», 1967, v. 242, p. 2502—2506.
- Stegemann H.* Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd. — «Hoppe. — Seylers Z. physiol. Chem.», 1958, Bd 311, S. 41—45.
- Stein W. H.* A chromatographic investigation of the amino acid constituents of normal urine. — «J. biol. Chem.», 1953, v. 201, p. 45—49.
- Stein W. H., Moore S.* The free amino acids of human blood plasma. — «J. biol. Chem.», 1954, v. 211, p. 915—928.
- Straus W.* Colorimetric determination of cytochrome c oxidase by formation of a quinonediimonium pigment from dimethyl-p-phenylenediamine. — «Biochim. biophys. Acta», 1956, v. 19, p. 58—65.
- Studies on normal and leukemic leukocytes. IV. Tetrahydrofolate dependent enzyme systems and dihydrofolic reductase.* — «J. clin. Invest.», 1963, v. 42, p. 1899—1907. Aut.: J. R. Bertino, J. Silber, A. Frieman, A. Alenty, M. Albrecht, B. M. Gabrio, F. M. Huennekens.

- Sullis A., Alessio L., Manucci P.* Cellogel electrophoresis of hemoglobins. — «Clin. chim. Acta», 1968, v. 20, p. 449—453.
- Summer R. J.* Lipoid oxidase studies — a method for the determination of lipooxidase activity. — «Ind. Eng. Chem.», 1943, v. 15, p. 14—15.
- Sundaresan P. R., Coursin D. B.* Microassay of pyridoxal phosphate using L-tyrosine-1-¹⁴C and tyrosine apodecarboxylase. — In: Methods in enzymology. v. 18. Vitamins and coenzymes. D. B. McCormick, L. D. Wright (Eds). New York, 1970, p. 509—512.
- Swelling* and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. — «J. biol. Chem.», 1963, v. 238, p. 828—835. Aut.: F. E. Hunter, J. M. Gebecki, P. E. Hoffsten, J. Weinstein, A. Scott.
- Synthetic* polypeptides as substrates and inhibitors of collagen proline hydroxylase. — «Arch. Biochem.», 1968, v. 125, p. 779—789. Aut.: J. J. Hutton, A. Marglin, B. Witkop, J. Kurtz, A. Berger, S. Udenfriend.
- Tabor C. W., Tabor H., Ronethal S. M.* Purification of amine oxidase from beef plasma. — «J. biol. Chem.», 1954, v. 208, p. 645—661.
- Takeuchi M., Terayama H.* Preparation and chemical composition of rat liver cell membranes. — «Exp. cell Res.», 1965, v. 40, p. 32—44.
- Takeuchi T., Kivirikko K. I., Prockop D. J.* Increased protocollagen hydroxylase activity in the liver of rat with hepatic fibrosis. — «Biochem. biophys. Res. Commun.», 1967, v. 28, p. 940—944.
- Tata J. R.* Preparation and properties of microsomal and submicrosomal fractions from animal cells. — In: Subcellular components. Preparation and fractionation. Birnie G. D., Fox S. M. (Eds). London, 1969, p. 83—107.
- Tay-Sachs disease.* Detection of heterozygotes and homozygotes by serum hexosaminidase assay. — «New Engl. J. Med.», 1970, v. 283, p. 15—20. Aut.: J. S. O'Brien, S. Okada, A. Chen, D. L. Fillerup.
- Thomson W. H.* Skeletal muscle glycogenosis: an investigation of two dissimilar cases. — «J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.», 1963, v. 26, p. 60—67.
- Thiselius A., Hjerten S., Levin O.* Protein chromatography on calcium phosphate columns. — «Arch. Biochem.», 1956, v. 65, p. 132—135.
- Trautschold I., Werle E.* Assay methods in the kinin system. — In Handbook of Exptl. Pathology, 1970, v. 25, p. 52—81.
- (Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.) Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауфер Дж. Ф.* Манометрические методы изучения тканевого обмена. Пер. с англ. М., Изд-во иностран. лит-ры, 1951, с. 296.
- Varon S., Nomura J., Shooter E. M.* Isolation of mouse nerve growth factor of high molecular weight form. — «Biochemistry (Wash.)», 1967, v. 6, p. 2202—2213.
- Wang P., Esmann V.* A new assay of phosphorylase based of the filter paper technique. — «Analyt. Biochem.», 1972, v. 47, p. 495—500.
- Wannemacher R. W., Wannemacher C. I., Yatvin M. B.* Amino acid regulation of synthesis of ribonucleic acid and protein in the liver of rats. — «Biochem. J.», 1971, v. 124, p. 385—390.
- Werle E., Zickgraf-Rudel G.* Natural proteinase inhibitors. Distribution, specificity, mode of action and physiological significance. — «Z. klin. Chem.», 1972, Bd 10, S. 139—150.
- Wettenhall R. E. H., Woore G., Sherton C. C.* Two physically and functionally distinct forms of eucariotic 40S ribosomal subunits. — «Biochemistry (Wash.)», 1973, v. 12, p. 2403—2411.

- Whistler R. L., Durso D. F.* Chromatographic separation of sugars on charcoal. — «J. Am. chem. Soc.», 1950, v. 72, p. 677—679.
- Wolff E. C., Schirmer E. W., Folk J. E.* The kinetics of carboxypeptidase B activity. I. Kinetic parameters. — «J. biol. Chem.», 1962, v. 237, p. 3094—3099.
- Yang H. Y. T., Erdős E. G., Levin J.* A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. — «Biochim. biophys. Acta», 1970, v. 214, p. 374—376.
- Zak R., Rabinowitz M., Platt C.* Ribonucleic acids associated with myofibrils. — «Biochemistry (Wash.)», 1967, v. 6, p. 2493—2499.
- Zeller E. A.* Diamine oxidase: specificity and mechanism. — «Adv. Biochem. Psychopharm.», 1972, v. 5, p. 167—180.
- Ziegler D. M., Pettit F. H.* Formation of an intermediate N-oxide in the oxidative demethylation of N,N-dimethylaniline catalyzed by liver microsomes. — «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 1964, v. 15, p. 188—192.

Modern methods in biochemistry. EDITED BY V. N. OREKHOVICH. M., «Meditsina», 1977, 392 pp., ill.

The book comprizes 68 sections grouped into 3 parts. Each section presents a brief but exact and comprehensive description of one or several modern biochemical methods.

The first part deals with methods employed in studies of enzymes and of products of nitrogenous, carbohydrate and oxidative metabolism in human and animal tissues. Concise account is given of methods developed for studies of oxidative enzyme system in liver and for estimation of lipid peroxidation products. The studies of carbohydrate metabolism are represented by a number of modern methods including those employed in prenatal diagnostics of Tay-Sachs disease and in diagnostics of glycogenoses.

The second part includes methods used in studies of biologically active peptides and of proteins and enzymes participating in their metabolism. Studies of the angiotensinogen system are represented by the fluorimetric method for estimation of carboxypeptidase activity and by the method for isolation of angiotensinogen. Methods used in the kinin system studies are also considered, specifically, those for isolation of kallikrein and kininase I from human blood and for determination of their activities.

Studies of proteins are exemplified by several widely used methods, such as affinity chromatography and colorimetric estimation of SH groups. Some procedures of limited utility to be used in protein studies are also described, for instance, ultracentrifugation of blood lipoproteins.

The third part of the book presents methods used in studies of protein biosynthesis in animal tissues, among them the method for determination of the time required for biosynthesis of a single polypeptide chain, immunochemical method for isolation of polysomes and some others. Two cell-free systems used in the protein biosynthesis studies are described.

The book is designed for research biochemists and for clinical physicians specializing in biochemistry.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
ЧАСТЬ ПЕРВАЯ	
Методы исследования ферментов азотистого, окислительного и углеводного обменов	5
Колориметрический метод определения диаминоксидазной активности — М. И. Турков, Г. И. Климова, Г. А. Давыдова, К. М. Ермолаев, В. З. Горкии	5
Очистка диаминоксидазы из почек свиньи — Л. Н. Стесина	9
Модифицированный метод очистки диаминоксидазы из почек свиньи — Г. И. Климова	13
Определение моноаминоксидазной активности митохондрий при помощи дихлоризоциануратной реакции — Р. С. Кривченкова	17
Определение моноаминоксидазной активности с п-нитрофенилэтиламином в качестве субстрата — Г. Д. Исаханян, Ж. И. Акопян	19
Методы солюбилизации и очистки моноаминоксидаз митохондрий тканей животных	21
Солюбилизация неионным детергентом и очистка моноаминоксидазы мозга быка — Т. А. Москвитина	22
Солюбилизация неионным детергентом и очистка моноаминоксидазы печени быка — Ж. И. Акопян	26
Солюбилизация ультразвуковыми волнами в сочетании с действием неионного детергента и очистка моноаминоксидазы печени крысы — И. С. Северина	30
Солюбилизация при помощи метилэтилкетона и очистка моноаминоксидазы печени свиньи — И. С. Северина	34
Потенциометрический метод определения активности аденилатдезаминаз — В. А. Пеккель, Ж. И. Акопян	38
Очистка аденилатдезаминазы скелетных мышц крысы — Ж. И. Акопян, А. З. Киркель	41
Определение активности сукцинатдегидрогеназы в суспензии митохондрий — Р. С. Кривченкова	44
Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий — Р. С. Кривченкова	47
Выделение микросомной фракции печени и характеристика ее окислительных систем — И. И. Карузина, А. И. Арчаков	49
Методы определения некоторых продуктов перекисного окисления липидов в тканях животных	62
Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот — И. Д. Стальная	63
Метод определения гидроперекисей липидов с помощью тиоцианата аммония — Л. А. Романова, И. Д. Стальная	64
Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты — И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили	66

Ферментативный микрометод определения пиридоксаль-5'-фосфата при помощи апотриптофаназы <i>E. coli</i> — Ю. В. Букин, А. В. Сергеев	68
Микрометод определения активности пиридоксалькиназы в тканях млекопитающих и человека — Ю. В. Букин	76
Определение активности серин-оксиметилтрансферазы в тканях млекопитающих — А. В. Сергеев	80
Метод определения содержания аргинина в моче и сыворотке крови — Л. П. Алексеенко	86
Методы динамического исследования рН, рNa ⁺ и рK ⁺ в биологических жидкостях и тканях организма — Е. А. Юматов	91
Определение активности гликогенфосфорилазы — Е. В. Раменский	99
Метод выделения кислой α-глюкозидазы (γ-амилазы) из тканей человека и животных с помощью хроматографии сродства на сефадексе — Д. М. Беленький	104
Метод определения мальтазной и глюкоамилазной активностей кислой α-глюкозидазы (γ-амилазы) после электрофореза препарата фермента в полиакриламидном геле — Д. М. Беленький	109
Методы определения свободных и связанных 6-дезоксигексоз — Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба	113
Определение кетосахаров в биологических жидкостях — В. К. Городецкий, В. И. Михайлов	120
Определение активности дисахаридаз в слизистой кишечника человека — И. С. Лукомская	127
Методы определения активности N-ацетил-β-D-гексозаминидазы А для пренатальной диагностики болезни Тея—Сакса и выявления гетерозиготных носителей заболевания — И. В. Цветкова, А. Б. Козина	132
Методы биохимической диагностики гликогенозов — И. А. Попова, И. В. Чибисов	136

ЧАСТЬ ВТОРАЯ

Методы исследования биологически активных пептидов, белков и ферментов, участвующих в их обмене	147
Чувствительный флуориметрический метод определения активности карбоксикатепсина (пептидил-дипептидазы) в сыворотке крови человека по трипептиду ангиотензина I — Л. В. Павлихина, Ю. Е. Елисеева, В. Ф. Поздnev, В. Н. Орехович	147
Выделение ангиотензиногена из белковой пасты — отхода производства гамма-глобулина человека — Л. П. Алексеенко	151
Количественное определение калликреина и калликреиногена в сыворотке (плазме) крови человека — Т. С. Пасхина, А. В. Кринская	157
Получение частично очищенного препарата калликреина из сыворотки крови человека — А. В. Кринская, Т. С. Пасхина	163
Получение высокоочищенного препарата кининогена из плазмы крови кролика — Т. П. Егорова, Л. Г. Макевнина, Е. Б. Россинская, Т. С. Пасхина	170
Определение эстеразной активности карбоксипептидазы N(кининазы I) в крови человека. Синтез гиппурил-L-аргининовой	

кислоты — С. С. Трапезникова, Е. Б. Россинская, Б. Л. Крайнова, Е. С. Чаман, Т. С. Пасхина	180
Определение антитриптической активности в сыворотке крови человека — В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина	188
Получение высокоочищенного препарата термо- и кислотоста- бильного ингибитора трипсина (ТКСТИ) из сыворотки крови кролика — В. Ф. Нартикова, О. Г. Оглоблина, Р. И. Якубовская, Л. В. Платонова, Т. С. Пасхина	192
Новый микрометод определения активности протеиназ — Л. П. Алексеенко	205
Хроматография по сродству (биоспецифическая хроматогра- фия) — О. В. Казакова	215
Колориметрический метод определения SH-групп и —S—S-свя- зей в белках при помощи 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кис- лоты) — И. В. Веревкина, А. И. Точилкин, Н. А. Попо- ва	223
Ультрафильтрация биополимеров через ацетилцеллюлозные мембраны — Л. В. Воробьев, Р. И. Гвоздев	231
Очистка коммерческих препаратов протаминсульфата и их ис- пользование для выделения нуклеиновых кислот, кислых и ос- новных белков — Р. И. Гвоздев, А. В. Татьяненко, З. П. Белова, А. П. Садков	236
Электрофорез гемоглобинов на ацетилцеллюлозе — О. В. Тро- ицкая	241
Выделение фракций липопротеидов из сыворотки крови чело- века с помощью ультрацентрифугирования — Е. Н. Леви- това	248
Выделение фитогемагглютинаина из семян фасоли — И. М. Кар- манский	254
Метод определения лимфоцитстимулирующей активности фито- гемагглютинаина — Н. Н. Голубева	257
Метод определения содержания коллагеновых белков по окси- пролину — Т. В. Замараева	262
Определение ¹⁴ C-оксипролина как метод для изучения синтеза коллагена в модельных системах — Т. В. Замараева	265
Определение активности коллагеновой пролин-гидроксилазы — Т. В. Замараева	270
Метод освобождения бактериальных коллагеназ от примесей других протеолитических ферментов — А. Е. Берман, Т. А. Оборотова	273

ЧАСТЬ ТРЕТЬЯ

Методы исследования белоксинтезирующей системы животных клеток	277
Методы определения времени синтеза полипептидной цепи — В. Л. Лейтин, М. И. Лерман	277 ✓
Методы анализа механизма действия противоопухолевых сое- динений, повреждающих белоксинтезирующую систему живот- ных клеток — О. Ю. Абакумова	285 ✓
Иммунохимический метод выделения индивидуальных полири- босом — Е. В. Сидорова, М. Г. Трудюбова	293
Метод выделения полирибосом, свободных и связанных с мем- бранами цитоплазматической сети — А. Е. Берман	300

Методы получения биологически активных рибосомных субъединиц из рибосом 80 S-класса — О. Ю. Абакумова . . .	303
Выделение и исследование рибосом сердечной мышцы — М. П. Явич	309
Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных — М. Г. Трудюлова	313 ✓
Метод выделения и очистки содержащей поли(А) мРНК из клеток млекопитающих — Е. В. Любимова, О. В. Подобед	316
Исследование процесса распада РНК в сердечной мышце — М. П. Явич	322
Выделение плазматических мембран клеток животных — А. В. Поспелова	326
Методы выделения мембран цитоплазматической сети — А. Д. Златопольский	329
Выделение фактора роста нервной ткани из слюнных желез мышей — Н. А. Кузьмичева	335
Метод фракционирования меченых клеточных макромолекул с помощью мйллипоровых фильтров — О. Ю. Абакумова	338
Метод радиоавтографии — И. Д. Беляева	343
Фракционирование гистоновых белков печени крысы — Н. В. Смирнова	349 ✓
Бесклеточная микросомная система биосинтеза коллагена и других белков — А. Е. Берман	353
Бесклеточная белоксинтезирующая система из клеток асцитной карциномы Кребс-2 — Т. Ю. Угарова	358
Приложение	369
Литература	371

ИБ № 886

Современные методы в биохимии

Редактор Е. М. Кедрова
Художественный редактор В. А. Григорьевская
Корректор Л. П. Тарарина
Техн. редактор Т. А. Волкова
Переплет художника В. А. Тогобицкого

Сдано в набор 2/III 1977 г. Подписано к печати 29/VI 1977 г. Формат бумаги $84 \times 108^{1/32} = 12,25$ печ. л. (условных 20,58. л.). 21,14 уч.-изд. л. Бум. тип. № 2. Тираж 12 000 экз. Т-13117. МН-71. Цена 1 р. 60 к. Заказ 1563.

Издательство «Медицина». Москва, Петроверигский пер., 6/8
Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Москва, 113105, Нагатинская ул., д. 1.